

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

11.12.03

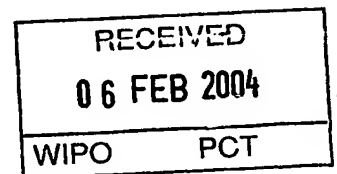
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2002年12月13日

出 願 番 号  
Application Number: 特願2002-362878  
[ST. 10/C]: [JP2002-362878]

出 願 人  
Applicant(s): 株式会社ニチレイ

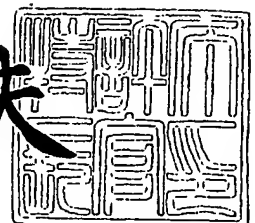


PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 1月22日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 P02-0366

【提出日】 平成14年12月13日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12Q 1/68

【発明の名称】 ビブリオコレラ又はビブリオミミカスの検出用プライマー及びプローブ並びにそれらを用いる検出方法

【請求項の数】 42

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県千葉市美浜区新港 9 番地 株式会社ニチレイ 技術開発センター内

【氏名】 小泉 雄史

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県千葉市美浜区新港 9 番地 株式会社ニチレイ 技術開発センター内

【氏名】 西山 葉子

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県千葉市美浜区新港 9 番地 株式会社ニチレイ 技術開発センター内

【氏名】 山本 敏

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県相模原市淵野辺 1 - 1 7 - 7 1 麻布大学環境保健学部内

【氏名】 福山 正文

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県相模原市淵野辺 1 - 1 7 - 7 1 麻布大学環境保健学部内

【氏名】 古畑 勝則

**【発明者】**

**【住所又は居所】** 神奈川県相模原市渕野辺 1 - 1 7 - 7 1 麻布大学環境  
保健学部内

**【氏名】** 大仲 賢二

**【特許出願人】**

**【識別番号】** 000134970

**【氏名又は名称】** 株式会社 ニチレイ

**【代理人】**

**【識別番号】** 100091096

**【弁理士】**

**【氏名又は名称】** 平木 祐輔

**【選任した代理人】**

**【識別番号】** 100118773

**【弁理士】**

**【氏名又は名称】** 藤田 節

**【選任した代理人】**

**【識別番号】** 100096183

**【弁理士】**

**【氏名又は名称】** 石井 貞次

**【手数料の表示】**

**【予納台帳番号】** 015244

**【納付金額】** 21,000円

**【提出物件の目録】**

**【物件名】** 明細書 1

**【物件名】** 図面 1

**【物件名】** 要約書 1

**【包括委任状番号】** 9913335

**【プルーフの要否】** 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ビブリオコレラ又はビブリオミミカスの検出用プライマー及びプローブ並びにそれらを用いる検出方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列表中の配列番号1のDNAジャイレース  $\beta$  サブユニットをコードする遺伝子 (gyrB) の断片でビブリオコレラ及びビブリオミミカス菌群に特有な次の位置番号 (塩基番号とも言う) 21、96、107、126、153、190、258、270、279、285、357、543、552、557、600、690、702、714、729、733、734、759、771、782、786、792、795又は885のいずれかの塩基を含む特異的な遺伝子増幅プライマー又はプローブの設計に用いることができる配列番号 1 で表される遺伝子断片。

【請求項 2】 請求項 1 記載の断片を含む配列表中の配列番号1のDNAジャイレース  $\beta$  サブユニットをコードする遺伝子 (gyrB) 中で、ビブリオコレラ及びビブリオミミカス菌群に特有な次の位置番号21、96、107、126、153、190、258、270、279、285、357、543、552、557、600、690、702、714、729、733、734、759、771、782、786、792、795又は885のいずれかの塩基を含む連続する15塩基以上からなる鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー。

【請求項 3】 請求項 1 で指定されたビブリオコレラ及びビブリオミミカス菌群に特有な位置を 2 位置以上の高頻度で含む領域を用いることを特徴とする請求項 2 記載の遺伝子増幅プライマー。

【請求項 4】 3 ‘末端の塩基が該ビブリオコレラ及びビブリオミミカス菌群に特有な請求項 1 で特定される位置番号の塩基であることを特徴とする請求項 2 記載の遺伝子増幅プライマー。

【請求項 5】 遺伝子増幅プライマーが

- (1) 5 ‘-tycaywcscaaacttacca-3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (2) 5 ‘-gaaytctggcgtgtcgatcaag-3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (3) 5 ‘- catrtagttgttcaaagtacgg-3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (4) 5 ‘- ggatttyacytccgaagaaacyagc -3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (5) 5 ‘- ygccagcttctcattnatr -3’ 若しくは対応する相補鎖、

- (6) 5 ‘-cgcttcgcttggttttcc-3’ 若しくは対応する相補鎖、又は  
(7) 5 ‘-caataatcttcgaacaaacgt-3’ 若しくは対応する相補鎖のいずれかである請求項 2 記載の遺伝子増幅プライマー。

【請求項 6】 配列表中の配列番号 1 の DNA ジャイレース  $\beta$  サブユニットをコードする遺伝子 (gyrB) 中で、ビブリオコレラ及びビブリオミミカス菌群に特有な次の位置番号 21、96、107、126、153、190、258、270、279、285、357、543、552、557、600、690、702、714、729、733、734、759、771、782、786、792、795 又は 885 のいずれかの塩基を含む連続する 15 塩基以上からなる鎖又はその相補鎖を含むビブリオコレラ及びビブリオミミカス検出、定量又は同定用プローブ。

【請求項 7】 配列表中の配列番号 2 の RNA ポリメラー  $\sigma$  70 因子をコードする遺伝子 (rpoD) 中で、ビブリオコレラ及びビブリオミミカス菌群に特有な次の位置番号 3、27、66、67、75、90、117、123、141、144、177、178、180、186、223、227、228、231、250、251、255、257、259、264、300、301、302、303、305、313、314、350、351、362、369、373、374、380、390、400、402、409、410、415、416、423、427、433、444、447、504、510、513、543、556、558、618、638、649、663、685、711、747、757、762、763、又は 789 のいずれかの塩基を含む、特異的な遺伝子増幅プライマー又はプローブの設計に用いることができる配列番号 2 で表される遺伝子の断片。

【請求項 8】 配列表中の配列番号 2 の RNA ポリメラー  $\sigma$  70 因子をコードする遺伝子 (rpoD) 中で、ビブリオコレラ及びビブリオミミカス菌群に特有な次の位置番号 3、27、66、67、75、90、117、123、141、144、177、178、180、186、223、227、228、231、250、251、255、257、259、264、300、301、302、303、305、313、314、350、351、362、369、373、374、380、390、400、402、409、410、415、416、423、427、433、444、447、504、510、513、543、556、558、618、638、649、663、685、711、747、757、762、763、又は 789 のいずれかの塩基を含む連続する 15 塩基以上からなる鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー。

【請求項 9】 請求項 8 で指定されたビブリオコレラ及びビブリオミミカス菌群に特有な位置を 2 位置以上の高頻度で含む領域を用いることを特徴とする請求項 8 記載の遺伝子増幅プライマー。

【請求項 1 0】 3 ‘末端の塩基が該ビブリオコレラ及びビブリオミミカス菌群に特有な請求項 8 で特定される位置番号の塩基であることを特徴とする請求項 8 記載の遺伝子増幅プライマー。

【請求項 1 1】 遺伝子増幅プライマーが

- (1) 5 ‘-gattgctgagtatcctggaaccatc-3’ 若しくは対応する相補鎖、
  - (2) 5 ‘-gaycctaacgacatggaaacc-3’ 若しくは対応する相補鎖、
  - (3) 5 ‘-ttcwgarcytytctgaagcs-3’ 若しくは対応する相補鎖、
  - (4) 5 ‘-agatgaygmkgctcgysgar-3’ 若しくは対応する相補鎖、
  - (5) 5 ‘-cgacggtgaaagyagcgacag-3’ 若しくは対応する相補鎖、
  - (6) 5 ‘-caatgaactgcgcggyaagtt-3’ 若しくは対応する相補鎖、
  - (7) 5 ‘-gtcacgaccaaattcattaac-3’ 若しくは対応する相補鎖、
  - (8) 5 ‘-gyytgamgcttcagawgcttgrtka-3’ 若しくは対応する相補鎖、
  - (9) 5 ‘-ygargtrcgcagagtttcaacc-3’ 若しくは対応する相補鎖、
  - (10) 5 ‘-catyaccaarcgytcttgg-3’ 若しくは対応する相補鎖、又は
  - (11) 5 ‘-cgytcaacagacagtgaawgtc-3’ 若しくは対応する相補鎖のいずれかで
- ある請求項 8 項記載の遺伝子増幅プライマー。

【請求項 1 2】 配列表中の配列番号2のRNAポリメラーゼ  $\sigma$  70 因子をコードする遺伝子 (rpoD) 中で、ビブリオコレラ及びビブリオミミカス菌群に特有な次の位置番号3、27、66、67、75、90、117、123、141、144、177、178、180、186、223、227、228、231、250、251、255、257、259、264、300、301、302、303、305、313、314、350、351、362、369、373、374、380、390、400、402、409、410、415、416、423、427、433、444、447、504、510、513、543、556、558、618、638、649、663、685、711、747、757、762、763、又は789のいずれかの塩基を含む連続する15塩基以上からなる鎖又はその相補鎖を含むビブリオコレラ及びビブリオミミカス菌群検出、定量又は同定用プローブ。

【請求項 1 3】 請求項 2 - 6、又は 8 - 1 2 のいずれか1項に記載のプライマー又はプローブを用いるビブリオコレラ及びビブリオミミカス菌群を検出、定量又は同定する方法。

【請求項 1 4】 請求項 2 - 6、又は 8 - 1 2 のいずれか1項に記載のプラ

イマー又はプローブを用いるビブリオコレラ及びビブリオミミカス菌群を検出、定量又は同定するキット。

【請求項 15】 配列表中の配列番号3のDNAジャイレース  $\beta$  サブユニットをコードする遺伝子 (gyrB) 中で、ビブリオコレラ菌群に特有な次の位置番号15、36、39、42、45、48、51、90、111、133、226、285、291、306、330、384、390、399、507、708、756、837、867、873、879、882、又は885のいずれかの塩基を含む、特異的な遺伝子増幅プライマー又はプローブの設計に用いることができる配列番号3で表される遺伝子の断片。

【請求項 16】 配列表中の配列番号3のDNAジャイレース  $\beta$  サブユニットをコードする遺伝子 (gyrB) 中で、ビブリオコレラ菌群に特有な次の位置番号15、36、39、42、45、48、51、90、111、133、226、285、291、306、330、384、390、399、507、708、756、837、867、873、879、882、又は885のいずれかの塩基を含む連続する15塩基以上からなる鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー。

【請求項 17】 3 ‘末端の塩基がビブリオコレラ菌群に特有な請求項 16 で特定される位置番号の塩基であることを特徴とする請求項 16 記載の遺伝子増幅プライマー。

【請求項 18】 請求項 16 で指定されたビブリオコレラ菌群に特有な位置を2以上の高頻度で含む領域を用いることを特徴とする請求項 16 記載の遺伝子増幅プライマー。

【請求項 19】 遺伝子増幅プライマーが

- (1) 5 ‘-ggtgggtaacgcgctytct-3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (2) 5 ‘-ycgatgaacgtgaagaagataaa-3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (3) 5 ‘-tgagaaaagtcttccacttt-3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (4) 5 ‘-gttaaagtgggaagactttc-3’ 若しくは対応する相補鎖、又は
- (5) 5 ‘-gggtaagccwgcaagatcc-3’ 若しくは対応する相補鎖、のいずれかである請求項 16 項記載のプライマー。

【請求項 20】 配列表中の配列番号3のDNAジャイレース  $\beta$  サブユニットをコードする遺伝子 (gyrB) 中で、ビブリオコレラ菌群に特有な次の位置番号15、

36、39、42、45、48、51、90、111、133、226、285、291、306、330、384、390、399、507、708、756、837、867、873、879、882、又は885のいずれかの塩基を含む連続する15塩基以上からなる鎖又はその相補鎖を含むビブリオコレラ菌群検出、定量又は同定用プローブ。

【請求項 2 1】 配列表中の配列番号4のRNAポリメラーゼ  $\sigma$  70因子をコードする遺伝子 (rpoD) 中で、ビブリオコレラ菌群に特有な次の位置番号12、93、96、105、114、115、116、117、126、132、141、156、198、201、216、222、231、240、252、254、255、260、261、264、276、285、291、327、333、342、345、424、426、432、441、445、446、448、450、453、468、489、495、501、519、522、525、540、549、570、585、591、600、603、606、639、645、654、657、666、675、679、680、681、687、702、705、708、714、720、723、729、732、741、750、765、768、795又は804のいずれかの塩基を含む、特異的な遺伝子増幅プライマー又はプローブの設計に用いることができる配列番号4で表される遺伝子の断片。

【請求項 2 2】 配列表中の配列番号4のRNAポリメラーゼ  $\sigma$  70因子をコードする遺伝子 (rpoD) 中で、ビブリオコレラ菌群に特有な次の位置番号12、93、96、105、114、115、116、117、126、132、141、156、198、201、216、222、231、240、252、254、255、260、261、264、276、285、291、327、333、342、345、424、426、432、441、445、446、448、450、453、468、489、495、501、519、522、525、540、549、570、585、591、600、603、606、639、645、654、657、666、675、679、680、681、687、702、705、708、714、720、723、729、732、741、750、765、768、795又は804のいずれかの塩基を含む連続する15塩基以上からなる鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー。

【請求項 2 3】 3 ‘末端の塩基が該ビブリオコレラ菌群に特有な請求項 2 2 で特定される位置番号の塩基であることを特徴とする請求項 2 2 記載の遺伝子増幅プライマー。

【請求項 2 4】 請求項 2 2 で指定されたビブリオコレラ菌群に特有な位置を 2 以上の高頻度で含む領域を用いることを特徴とする請求項 2 2 記載の遺伝子増幅プライマー。



**【請求項 2 5】** 遺伝子増幅プライマーが、

- (1) 5 ‘-attcttgagcagtttgatcgt-3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (2) 5 ‘-caggccgaagagctacgtctc-3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (3) 5 ‘-tgagctttctgaagcggatctcgcg-3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (4) 5 ‘-gaagatgatgctgtcgtcgaa-3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (5) 5 ‘-gaagatgaagacgaagat-3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (6) 5 ‘-cggtatcgaccctgaactg-3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (7) 5 ‘-catcaagcttctgaagcgtcaga-3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (8) 5 ‘-acggaagatatccarcactaa-3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (9) 5 ‘-tcaaccaagtggtcgaattgc-3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (10) 5 ‘-gcgaacacgatccattgaagtg-3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (11) 5 ‘-gatgaacgatttcttcggcatc-3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (12) 5 ‘-aaggactttatccagccac-3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (13) 5 ‘-ttcttcttgctcacggactttcg-3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (14) 5 ‘-ttctgaattgaacggcggatc-3’ 若しくは対応する相補鎖、又は
- (15) 5 ‘-tgtctcttgctcgatcatttgt-3’ 若しくは対応する相補鎖のいずれかである、請求項 2 2 記載の遺伝子増幅プライマー。

**【請求項 2 6】** 配列表中の配列番号4のRNAポリメラーゼ 70 因子をコードする遺伝子 (rpoD) 中で、ビブリオコレラ菌群に特有な次の位置番号12、93、96、105、114、115、116、117、126、132、141、156、198、201、216、222、231、240、252、254、255、260、261、264、276、285、291、327、333、342、345、424、426、432、441、445、446、448、450、453、468、489、495、501、519、522、525、540、549、570、585、591、600、603、606、639、645、654、657、666、675、679、680、681、687、702、705、708、714、720、723、729、732、741、750、765、768、795又は804のいずれかの塩基を含む連続する15塩基以上からなる鎖又はその相補鎖を含むビブリオコレラ菌群検出、定量又は同定用プローブ。

**【請求項 2 7】** 請求項 1 6 - 2 0、又は 2 2 - 2 6 のいずれか1項に記載のプライマー又はプローブを用いるビブリオコレラ菌群を検出、定量又は同定する方法。

【請求項 2 8】 請求項 1 6 - 2 0、又は 2 2 - 2 6 のいずれか 1 項に記載のプライマー又はプローブを用いるビブリオコレラ菌群を検出、定量又は同定するキット。

【請求項 2 9】 配列表中の配列番号 5 の DNA ジャイレース  $\beta$  サブユニットをコードする遺伝子 (gyrB) 中で、ビブリオミミカス菌群に特有な次の位置番号 15、36、39、42、45、48、51、90、111、133、226、285、291、306、330、384、390、399、507、708、756、837、867、873、879、882、又は 885 のいずれかの塩基を含む、特異的な遺伝子増幅プライマー又はプローブの設計に用いることができる配列番号 5 で表される遺伝子の断片。

【請求項 3 0】 配列表中の配列番号 3 の DNA ジャイレース  $\beta$  サブユニットをコードする遺伝子 (gyrB) 中で、ビブリオミミカス菌群に特有な次の位置番号 15、36、39、42、45、48、51、90、111、133、226、285、291、306、330、384、390、399、507、708、756、837、867、873、879、882、又は 885 のいずれかの塩基を含む連続する 15 塩基以上からなる鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー。

【請求項 3 1】 請求項 3 0 で指定されたビブリオミミカス菌群に特有な位置を 2 以上の高頻度で含む領域を用いることを特徴とする請求項 3 0 記載の遺伝子増幅プライマー。

【請求項 3 2】 3 ‘末端の塩基が該ビブリオミミカス菌群に特有な請求項 3 1 で特定される位置番号の塩基であることを特徴とする請求項 3 0 記載の遺伝子増幅プライマー

【請求項 3 3】 遺伝子増幅プライマーが

- (1) 5 ‘-ggtagtgaatgccctgtca-3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (2) 5 ‘-cggatgagcgtgaagaagataag-3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (3) 5 ‘-tgaaaaagtattccacttc-3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (4) 5 ‘-gttgaagtgaataactttt-3’ 若しくは対応する相補鎖、又は
- (5) 5 ‘-wggcaaaccagckarrtct-3’ 若しくは対応する相補鎖のいずれかである請求項 3 0 記載の遺伝子増幅プライマー。

【請求項 3 4】 配列表中の配列番号 5 の DNA ジャイレース  $\beta$  サブユニットを

コードする遺伝子 (gyrB) 中で、ビブリオミミカス菌群に特有な次の位置番号15、36、39、42、45、48、51、90、111、133、226、285、291、306、330、384、390、399、507、708、756、837、867、873、879、882、又は885のいずれかの塩基を含む連続する15塩基以上からなる鎖又はその相補鎖を含むビブリオミミカス菌群検出、定量又は同定用プローブ。

【請求項 3 5】 配列表中の配列番号6のRNAポリメラーゼ  $\sigma$  70因子をコードする遺伝子 (rpoD) 中で、ビブリオミミカス菌群に特有な次の位置番号12、93、96、105、114、115、116、117、126、132、141、156、198、201、216、222、231、240、252、254、255、260、261、264、276、285、291、327、333、342、345、424、426、432、441、445、446、448、450、453、468、489、495、501、519、522、525、540、549、570、585、591、600、603、606、639、645、654、657、666、675、679、680、681、687、702、705、708、714、720、723、729、732、741、750、765、768、795又は804のいずれかの塩基を含む、特異的な遺伝子増幅プライマー又はプローブの設計に用いることができる配列番号6で表される遺伝子の断片。

【請求項 3 6】 配列表中の配列番号6のRNAポリメラーゼ  $\sigma$  70因子をコードする遺伝子 (rpoD) 中で、ビブリオミミカス菌群に特有な次の位置番号12、93、96、105、114、115、116、117、126、132、141、156、198、201、216、222、231、240、252、254、255、260、261、264、276、285、291、327、333、342、345、424、426、432、441、445、446、448、450、453、468、489、495、501、519、522、525、540、549、570、585、591、600、603、606、639、645、654、657、666、675、679、680、681、687、702、705、708、714、720、723、729、732、741、750、765、768、795又は804のいずれかの塩基を含む連続する15塩基以上からなる鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー。

【請求項 3 7】 請求項 3 6 で指定されたビブリオミミカス菌群に特有な位置を 2 以上の高頻度で含む領域を用いることを特徴とする請求項 3 6 記載の遺伝子増幅プライマー。

【請求項 3 8】 3 '末端の塩基が該ビブリオミミカス菌群に特有な請求項 3 6 で特定される位置番号の塩基であることを特徴とする請求項 3 6 記載の遺伝子

増幅プライマー。

【請求項 3 9】 遺伝子プライマーが

- (1) 5 ‘-cattcttgaacagtttgacaag-3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (2) 5 ‘-caggcagaagaactacgtctg-3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (3) 5 ‘-agarctctctgaagccgatctcgct-3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (4) 5 ‘-gaagatgacgaggtcgcgag-3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (5) 5 ‘-gaggatgaagatgaagac-3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (6) 5 ‘-gggtattgaccctgagctc-3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (7) 5 ‘-taacaaagcatctgaagcttcaag-3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (8) 5 ‘-gcggaaratatccagtaccag-3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (9) 5 ‘-tcaaccaaattggtcaaattgt-3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (10) 5 ‘-acgaacacgatccatcgaggta-3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (11) 5 ‘-aataaatgatttctttggcatt-3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (12) 5 ‘-gagyactttatcragccat-3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (13) 5 ‘-gtcttcttgctcacgtactttttg-3’ 若しくは対応する相補鎖、
- (14) 5 ‘-ttggattgaagggcgaata-3’ 若しくは対応する相補鎖、又は
- (15) 5 ‘-agtctcytgttcgatcatctgm-3’ 若しくは対応する相補鎖のいずれかである請求項 3 6 記載の遺伝子増幅プライマー。

【請求項 4 0】 配列表中の配列番号6のRNAポリメラーゼ  $\sigma$  70因子をコードする遺伝子 (rpoD) 中で、ビブリオミミカス菌群に特有な次の位置番号12、93、96、105、114、115、116、117、126、132、141、156、198、201、216、222、231、240、252、254、255、260、261、264、276、285、291、327、333、342、345、424、426、432、441、445、446、448、450、453、468、489、495、501、519、522、525、540、549、570、585、591、600、603、606、639、645、654、657、666、675、679、680、681、687、702、705、708、714、720、723、729、732、741、750、765、768、795又は804のいずれかの塩基を含む連続する15塩基以上からなる鎖又はその相補鎖を含むビブリオミミカス菌群検出、定量又は同定用プローブ。

【請求項 4 1】 請求項 3 0 - 3 4、又は 3 6 - 4 0 のいずれか1項に記載

のプライマー又はプローブを用いるビブリオミミカス菌群を検出、定量又は同定する方法。

【請求項 4 2】 請求項 3 0 - 3 4、又は 3 6 - 4 0 のいずれか 1 項に記載のプライマー又はプローブを用いるビブリオミミカス菌群を検出、定量又は同定するキット。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】

本発明は、食品検査、疫学的環境検査、並びに臨床検査における、ビブリオコレラ及びビブリオミミカスの検出・同定・計数方法に関するものである。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】

ビブリオコレラは経口感染の後、コレラ毒素を産生し、激しい下痢と嘔吐を引き起こす。場合によっては、極度の脱水症状のため、死亡することもある感染症細菌である。ヒトに対し毒性を示すビブリオコレラは抗 O 1 抗体で凝集する O 1 コレラのみであり、それ以外の菌は O 1 非凝集 (O 1-non-agglutinable) ということで NAG (ナグ)-ビブリオと分類され、人に対する毒性を示さないとされてきた。しかし、1995 年にインドのベンガル地方で、それまでのコレラと同じ様な症状を起こす O 1 抗原を持たない新型のビブリオコレラが分離され、O 139 という新しい O 抗原を持つことが明らかとなった。この株は、ベンガル株と呼ばれ、従来の O 1 コレラと同様のコレラ毒素産生遺伝子を持ち、毒素を産生して、コレラ症を惹起することが明らかにされた。このことにより、O 1 コレラ以外でもヒトに感染しコレラ症の原因となり得ることが示された。実際、O 1、O 139 以外のビブリオコレラにもコレラ毒素遺伝子を有する株が存在し、ヒトに対してコレラ症を引き起こす。しかしながら、O 1 および O 139 以外のビブリオコレラによる症状は行政上感染症として取り扱われない。

【 0 0 0 3 】

一方で、ビブリオコレラの非 O 1 株の中に白糖非分解の株がまれに検出されていたが、Davis らが、ビブリオコレラとの DNA 相同性を調べることで、ビブリオコレ

ラとはやや異なることを示しビブリオミミカスとした。このビブリオミミカスはビブリオコレラと非常に近い種であり、生化学的性状では白糖分解能が異なる（ビブリオコレラが陽性、ビブリオミミカスが陰性）が、それ以外の性状は非常に似ていると報告されている（J.Clin.Microbiol.14,631-639 1981）（非特許文献 1）。ビブリオミミカスにはビブリオコレラと同様のコレラ毒素遺伝子を有する株が存在することが知られており（Microbiol Immunol 1998;42 823-828）（非特許文献 2）、コレラ症と同様の症状を引き起こす可能性がある。

#### 【0 0 0 4】

他方、コレラ毒素遺伝子を持たないビブリオコレラの中に、腸炎ビブリオの病原因子である耐熱性溶血毒素遺伝子（tdh）を持つ株（Appl Environ Microbiol 52:1218-20,1986）（非特許文献 3）や、大腸菌の耐熱性エンテロトキシンを産生する株（J.Clin.Invest.85:697-705,1990）（非特許文献 4）の存在が報告されており、下痢症などの原因となり得る。さらに、ビブリオミミカスにも同様に tdh 遺伝子を有する株が存在することが知られており（FEMS Microbiol 59:319-23,1990）（非特許文献 5）コレラ毒素を産生しない場合にも下痢症などの原因となり得る。

#### 【0.0 0 5】

上述の如く、血清型が 01 及び 0139（ベンガル）であり、コレラ毒素を産生するビブリオコレラが検出された場合には、“感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律”の定める措置の対象となる。さらに、01 コレラ及びベンガルコレラ以外のビブリオコレラにもコレラ毒素産生株が存在し、コレラ症と同様の症状を引き起こす。他方に、コレラ毒素非産生株であっても、コレラ症の原因とは成り得ないが、そのことが非病原性であることを意味するわけではなく、コレラ毒素以外の毒素を産生することにより急性胃腸炎、下痢症などを惹起する。従って、ビブリオコレラ菌群を迅速かつ正確に検出することが求められる。

#### 【0 0 0 6】

一方で、ビブリオミミカスにおいても、コレラ症の原因となり得るコレラ毒素を産生する株及びコレラ毒素以外の毒素を産生することにより急性胃腸炎、下痢症などの原因となり得る。故に、ビブリオミミカス菌群を迅速かつ正確に検出す

ることも求められる。

#### 【0007】

生化学的手法を用いた従来の検査方法は、熟練した技術と多大な労力と時間を必要とする。この欠点を補うために、正確かつ迅速・簡便なビブリオコレラおよびビブリオミミカスの検出・同定を目的とした遺伝子による検査方法が試みられている。

#### 【0008】

コレラ症の原因であるコレラ毒素をコードする遺伝子を検出するプライマーが既に存在する (J. Biol. Chem. 1983;258, 13722-13726) (非特許文献6)。しかしながら、当該プライマーでは、コレラ毒素遺伝子を有さずに別の毒素を産生するビブリオコレラ及びビブリオミミカスを検出することは出来ない。

#### 【0009】

一方、ビブリオコレラとビブリオミミカスの16S rRNA遺伝子塩基配列を全長で比較すると、1,456塩基のうち6塩基しか異ならない (Int. J. Syst. Bacteriol. 44, 416-426 1994) (非特許文献7) ために、明確に区別することは不可能であることから、ビブリオコレラとビブリオミミカスの16S-23S rRNA Intergenic Spacer Regionを比較し、ビブリオコレラとビブリオミミカスが分類可能であることを示し、ビブリオコレラのみを検出可能なプライマーを作成した報告 (Appl. Environ. Microbiol. 65, 2202-2208 1999) (非特許文献8) も存在しているが、当該プライマーを用いた場合に、ビブリオミミカスを誤って検出してしまうとの報告も存在する (Appl. Environ. Microbiol. 67, 2360-2364 2001) (非特許文献9)。

#### 【0010】

##### 【非特許文献1】

J. Clin. Microbiol. 14, 631-639, 1981

##### 【非特許文献2】

Microbiol Immunol 1998;42 823-828

##### 【非特許文献3】

Appl. Environ. Microbiol. 52:1218-20, 1986

##### 【非特許文献4】

J. Clin. Invest. 85:697-705, 1990

【非特許文献 5】

FEMS Microbiol 59:319-23, 1990

【非特許文献 6】

J. Biol. Chem. 1983;258, 13722-13726

【非特許文献 7】

Int. J. Syst. Bacteriol. 44, 416-426, 1994

【非特許文献 8】

Appl. Environ. Microbiol. 65, 2202-2208, 1999

【非特許文献 9】

Appl. Environ. Microbiol. 67, 2360-2364, 2001

【0 0 1 1】

【発明が解決しようとする課題】

以上の様に、既存の遺伝子検出方法では、ビブリオコレラ及びビブリオミミカスを精度よく検出することができない。

【0 0 1 2】

従来の遺伝子検査方法に共通しているのは、細菌の「種」が遺伝的な多様性を内包する集団である事を無視している点に有る。ある細菌集団のメンバーと推測される1菌株の塩基配列を、その集団共通の、あるいは代表する配列として用いる事は、中立的変異を速やかに蓄積する遺伝子の分子進化の性質上大変危険である。即ち、本来検出されるべき菌株がプライマー領域の僅かな変異の為に増幅が阻害されて検出されなかったり、プライマーの特異性が十分でないために検出されるべきでない近縁株が検出されるといった誤判定の原因になる事が危惧される。そこで、特異性のバックグラウンドが証明されており、誤判定の可能性が低く、かつ実用上十分な増幅効率と増幅特異性を有する、高性能なビブリオコレラおよびビブリオミミカスの検出・同定・定量用特異遺伝子増幅プライマー、さらにビブリオコレラ、ビブリオミミカスをそれぞれ特異的に検出・同定・定量する遺伝子増幅プライマーの作成が必要とされていた。

【0 0 1 3】



## 【課題を解決するための手段】

細菌のある系統群の遺伝子の特異的に検出する方法を作成する為には、検出しようとする生物群、ならびにその系統的に近縁な生物群の塩基配列をなるべく多数収集する必要がある。また、特異検出のターゲットとする遺伝子は、最も近縁の生物とも判別可能なように、十分に異なる塩基配列を有している必要がある。この為には、十分に早い進化速度を有していなくてはならない。また、高頻度に水平伝播する遺伝子（たとえば腸炎ビブリオの毒素遺伝子）の様に、系統とは無関係に存在する遺伝子は用いる事が出来ない。本発明でターゲットとして用いた *gyrB* 遺伝子及び *rpoD* 遺伝子がコードするタンパク質は、生存に必須なタンパク質である。この為、水平伝播し難く、また適度な進化速度を有しているため、細菌の系統解析に適している（Int. J. Syst. Bacteriol. 1998;48, 813-819, Int. J. Syst. Bacteriol. 1999;49, 87-95）。発明者らは、既に *gyrB* 遺伝子及び *rpoD* 遺伝子の PCR ダイレクトシーケンス法による簡便な塩基配列の決定方法を開発している（特開平07-213229、特開平08-256798）。さらに、発明者らは、既に多数のビブリオコレラを単離しており、他方に、公知のビブリオミミカス保存株及び、16S rRNA 配列に基づく解析により本菌に近縁であることが報告されている *Listonella anguillarum*, *V. ordalii*, *V. diazotrophicus*, *V. vulnificus*, *V. navarrensis*, *V. metschnikovii*, *V. cincinnatiensis* (International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51, 1449-1456 (2001)) について、表 1 に示される菌株の *gyrB* および *rpoD* 遺伝子の部分塩基配列を解析し、その配列に基づいた分子系統解析を行い、その系統関係を明らかにした。

【0014】

【表1】

表1. 使用した菌株			
<i>V. Cholerae</i>	29株	臨床分離株	29株
<i>V. mimicus</i>	4株	ATCC 33653 T	
		ATCC 33654	
		ATCC 33655	
		ATCC 700326	
その他のビブリオ属保存株	52株		
<i>V. Vulnificus</i>	32株	ATCC 27562 T	
		ATCC 29306	
		ATCC 29307	
		ATCC 33147	
		ATCC 33148	
		ATCC 33149	
		ATCC 33814	
		ATCC 33815	
		ATCC 33816	
		ATCC 33817	
		ATCC 43382	
		ATCC BAA-86	
		ATCC BAA-87	
		ATCC BAA-88	
		ATCC BAA-89	
		ATCC BAA-90	
		JCM 3726	
		JCM 3727	
		JCM 3728	
		JCM 3729	
		JCM 3730	
		JCM 3731	
		環境分離株	10株
<i>V. diazotrophicus</i>		ATCC 33466 T	
<i>V. navarrensis</i>		ATCC 51183 T	
<i>V. metschnikovii</i>		ATCC 700040 T	
<i>V. cincinnatiensis</i>		ATCC 35912 T	
<i>V. ordalii</i>		NCIMB 2167 T	
<i>Listonella anguillarum</i>		NCIMB 6 T	
<i>V. hollisae</i>		ATCC 33564 T	
<i>V. alginolyticus</i>		IFO 15630 T	
<i>V. campbellii</i>		IFO 15631 T	
<i>V. carchariae</i>		IFO 15632 T	
<i>V. harveyi</i>		IFO 15634 T	
<i>V. nereis</i>		IFO 15637 T	
<i>V. parahaemolyticus</i>		IFO 12711 T	
<i>V. proteolyticus</i>		IFO 13287 T	
<i>V. tubiashii</i>		IFO 15644 T	
<i>Vibrio. sp</i>	5株	食品由来分離株	
合計85株			

【0015】

即ち、供試菌株を2%NaCl添加ブレインハートインフュージョン培地で増菌培養した後に、PUREGENE DNA Isolation Kit(Gentra SYSTEMS)を用いて染色体DNAを抽出した。抽出したDNAを鋳型として、gyrB増幅ユニバーサルプライマーUP-1E

およびAprUを用いて約900bp（大腸菌K-12株上の塩基配列上のポジション331 -1212；アミノ酸配列ではポジション111から 404に相当する領域）のgyrB遺伝子断片をPCR増幅した。また同様にrpoD増幅ユニバーサルプライマー70F-M13および70R-M13を用いて約800bp（大腸菌K-12株上の塩基配列上のポジション334-1125；アミノ酸配列ではポジション112から375に相当する領域）のrpoD遺伝子断片をPCR増幅した。得られたPCR産物は、1%アガロースゲルで電気泳動後、臭化エチジウムで染色し紫外線照射下でその存在を確認した後にWizard PCR Preps DNA Purification System(Promega)を用いて精製しシーケンス反応の鋳型とした。シーケンス反応は、ユニバーサルプライマーに予め付加してあるM13R、M13-21配列をプライマーとして用いABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit(PE Applied Biosystems)を用いてサイクルシーケンス反応を行い、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer(PE Applied Biosystems)にて配列を解析した。決定した塩基配列を用いて分子系統解析を行うにあたり、ビブリオコレラおよびミミカスの近傍をより正確に把握することを目的として、gyrBおよびrpoD遺伝子部分配列を結合させ解析を実施した。得られた塩基配列を、CLUSTAL Wコンピュータープログラムで多重アラインメント解析を行った後、PHYLPコンピュータープログラムパッケージを用い、木村の2パラメーターモデルで算出した遺伝的距離に基づいて近隣結合法により分子系統樹を作成した。この結果、ビブリオコレラ及びミミカスが他のビブリオ属細菌とは異なった単一の系統に属することが明らかとなった。さらに、ビブリオコレラ及びミミカスもそれぞれが独立した系統群を形成していることが示された。（図1）そこで、ビブリオコレラ及びミミカス菌群のみを検出可能な遺伝子検査法を確立するために、まず、近縁種間の塩基配列の差異を明らかとした。即ち、ビブリオコレラ及びミミカス群内では保存され、他のビブリオ属細菌とは異なっている塩基の位置を同定した。具体的には、ビブリオコレラ及びミミカスが属する系統群のコンセンサス配列を求めると共に、分子系統解析の結果から本系統に近縁であることが判明した図1中C1～C3の系統のコンセンサス配列を比較し、系統特異的情報図を作成した（図2、3）。図2より、gyrB遺伝子においては、配列表中の配列番号1の位置番号（塩基番号とも言う）21、96、107、126、153、190、258、270、279、285、357、543、552、557

、600、690、702、714、729、733、734、759、771、782、786、792、795又は885の位置、図3より、rpoD遺伝子においては配列表中の配列番号2の位置番号3、27、66、67、75、90、117、123、141、144、177、178、180、186、223、227、228、231、250、251、255、257、259、264、300、301、302、303、305、313、314、350、351、362、369、373、374、380、390、400、402、409、410、415、416、423、427、433、444、447、504、510、513、543、556、558、618、638、649、663、685、711、747、757、762、763、又は789の位置がビブリオコレラ及びミミカスに属する系統に特異的であることが明らかとなった。これら特徴的塩基を含む本系統に特異的な配列を用いることにより、高特異性を有するプローブ及び高特異性を有しかつ増幅効率に優れた遺伝子増幅プライマーを設計することが可能となる。例えば、近縁種と塩基が相違する位置を必ず含むように、当該近縁種と相違する塩基を含む連続する15塩基以上のgyrB及びrpoD遺伝子の塩基配列、好適には20塩基以上、更に好適には20塩基以上40塩基以下の連続するgyrBおよびrpoD遺伝子の塩基配列を用いてプライマーを設計することが可能となる。同様に、近縁種と塩基が相違する位置を必ず含むように、当該近縁種と相違する塩基を含む連続する15塩基以上のgyrBおよびrpoD遺伝子の塩基配列、好適には20塩基以上、更に好適には20塩基以上で100塩基以下の連続するgyrBおよびrpoD遺伝子の塩基配列を用いて、プローブを設計することが可能となる。さらに、当該プライマー及びプローブの作成には、上記相違塩基を2以上の高頻度で含む領域、例えば、gyrB遺伝子においては、96、107を含む領域、258、270、279、285のいずれかの位置を2以上含む領域、543、552、557のいずれかの位置を2以上含む領域、690、702、714のいずれかの位置を2以上含む領域、729、733、734のいずれかの位置を2以上含む領域、759、771を含む領域、782、786、792、795のいずれかの位置を2以上含む領域、rpoD遺伝子においては、66、67、75、90のいずれかの位置を2以上含む領域、177、178、180、186のいずれかの位置を2以上含む領域、223、227、228、231のいずれかの位置を2以上含む領域、250、251、255、257、259、264のいずれかの位置を2以上含む領域、300、301、302、303、305、313、314のいずれかの位置を2以上含む領域、362、369、373、374、380のいずれかの位置を2以上含む領域、400、402、409、410、415、416のいずれかの位置を2以上含む

む領域、423、427、433、444、447のいずれかの位置を2以上含む領域、504、510、513のいずれかの位置を2以上含む領域、543、556、558のいずれかの位置を2以上含む領域、747、757、762、763のいずれかの位置を2以上含む領域が好適に使用できる。また、プライマーの場合、3'末端がビブリオコレラ及びミミカス菌群に特異的な塩基であることが望ましい。本件発明は、これらプライマー及びプローブを他の試薬と組み合わせたビブリオコレラおよびミミカスの検出、定量又は同定用のキットを包含するものである。

#### 【0016】

他方、ビブリオコレラ及びミミカス菌群はさらに、ビブリオコレラ菌群とビブリオミミカス菌群が独立した系統を形成した（図1）ことから、ビブリオコレラ及びミミカス菌群をそれぞれ検出可能な遺伝子検査法を確立するために、先と同様に、ビブリオコレラ及びミミカス群内でそれぞれ保存された領域、及び互いに異なっている塩基の位置を同定した。具体的には、ビブリオコレラ及びミミカスが属する各系統群のコンセンサス配列を、互いに比較することで系統特異的情報図を作成した（図4、5、6、7）。ビブリオコレラが属する系統においては、*gyrB*遺伝子の場合、図4より、配列表中の配列番号3の位置番号15、36、39、42、45、48、51、90、111、133、226、285、291、306、330、384、390、399、507、708、756、837、867、873、879、882、又は885の位置、*rpoD*遺伝子においては図5より配列表中の配列番号4の位置番号12、93、96、105、114、115、116、117、126、132、141、156、198、201、216、222、231、240、252、254、255、260、261、264、276、285、291、327、333、342、345、424、426、432、441、445、446、448、450、453、468、489、495、501、519、522、525、540、549、570、585、591、600、603、606、639、645、654、657、666、675、679、680、681、687、702、705、708、714、720、723、729、732、741、750、765、768、795又は804の位置が特異的であることが明らかとなった。また、ビブリオミミカスが属する系統においては、*gyrB*遺伝子の場合、図6より、配列表中の配列番号5の位置番号15、36、39、42、45、48、51、90、111、133、226、285、291、306、330、384、390、399、507、708、756、837、867、873、879、882、又は885の位置、*rpoD*遺伝子においては、図7より、配列表中の配列番号6の位置番号12、93、96、105、114、115、1

16、117、126、132、141、156、198、201、216、222、231、240、252、254、255、260、261、264、276、285、291、327、333、342、345、424、426、432、441、445、446、448、450、453、468、489、495、501、519、522、525、540、549、570、585、591、600、603、606、639、645、654、657、666、675、679、680、681、687、702、705、708、714、720、723、729、732、741、750、765、768、795又は804の位置が特異的であることが明らかとなった。これら特徴的塩基を含むビブリオコレラ又はビブリオミミカスが属する系統に特異的な配列を用いることにより、高特異性を有するプローブ及び高特異性を有しかつ増幅効率に優れた遺伝子増幅プライマーを設計することが可能となる。例えば、ビブリオコレラとビブリオミミカスの塩基が相違する位置を必ず含むように、当該2菌種が相違する塩基を含む連続する15塩基以上のgyrBおよびrpoD遺伝子の塩基配列、好適には20塩基以上、更に好適には20塩基以上40塩基以下の連続するgyrBおよびrpoD遺伝子の塩基配列を用いてプライマーを設計することが可能となる。同様に、ビブリオミミカスとビブリオコレラの塩基が相違する位置を必ず含むように、当該2菌種が相違する塩基を含む連続する15塩基以上のgyrBおよびrpoD遺伝子の塩基配列、好適には20塩基以上、更に好適には20塩基以上で100塩基以下の連続するgyrBおよびrpoD遺伝子の塩基配列を用いて、プローブを設計することが可能となる。さらに、当該プライマー及びプローブの作成には、上記相違塩基を2以上の高頻度で含む領域、例えば、gyrB遺伝子においては、36、39、42、45、48、51のいずれかの位置を2以上含む領域、285、291、306のいずれかの位置を2以上含む領域、384、390、399のいずれかの位置を2以上含む領域、867、873、879、882、885のいずれかの位置を2以上含む領域、rpoD遺伝子においては、93、96、105、114、115、116、117のいずれかの位置を2以上含む領域、126、132、141のいずれかの位置を2以上含む領域、216、222、231、240のいずれかの位置を2以上含む領域、252、254、255、260、261、264のいずれかの位置を2以上含む領域、276、285、291のいずれかの位置を2以上含む領域、327、333、342、345のいずれかの位置を2以上含む領域、424、426、432、441、445、446のいずれかの位置を2以上含む領域、448、450、453、468のいずれかの位置を2以上含む領域、489、495、501のいずれかの位置を2以上含む領域、519、522、525、540のいずれかの位置

を2以上含む領域、585、591、600、603、606のいずれかの位置を2以上含む領域、639、645、654、657のいずれかの位置を2以上含む領域、666、675、679、680、681、687のいずれかの位置を2以上含む領域、702、705、708、714、720、723のいずれかの位置を2以上含む領域、729、732、741、750のいずれかの位置を2以上含む領域が好適に使用できる。また、プライマーの場合、3'末端がビブリオコレラ又はビブリオミミカスに特異的な塩基であることが望ましい。

#### 【0017】

具体的には、ビブリオコレラ及びミミカス菌群を検出、定量又は同定用のプライマーとしては、

(1) *gyrB*遺伝子については、配列番号1の位置番号96、107の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、配列番号1の位置番号258、270、279、285のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、配列番号1の位置番号543、552、557のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、配列番号1の位置番号690、702、714のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、配列番号1の位置番号729、733、734のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、配列番号1の位置番号759、771の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、配列番号1の位置番号782、786、792、795のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマーが挙げられ、より具体的には、5'-tycaywscaaacttacca-3' 又は対応する相補鎖、5'-gaaytctggcgtgtcgatcaag-3' 又は対応する相補鎖、5'-catrtagtgttcaaagtacgg-3' 又は対応する相補鎖、5'-ggatttyacytccgaagaacyagc-3' 又は対応する相補鎖、5'-ygccagcttctcattcatr-3' 又は対応する相補鎖、5'-cgcttcgcttgggttttcc-3' 又は対応する相補鎖、又は5'-caataatcttcgaaacaacgt-3' 又は対応する相補鎖のいずれかである遺伝子増幅プライマーが挙げられ、(2) *rpoD*遺伝子については、配列番号2の位置番号66、67、75、90のい

いずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、配列番号2の位置番号177、178、180、186のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、配列番号2の位置番号223、227、228、231のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、配列番号2の位置番号250、251、255、257、259、264のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、配列番号2の位置番号300、301、302、303、305、313、314のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、配列番号2の位置番号362、369、373、374、380のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、配列番号2の位置番号400、402、409、410、415、416のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、配列番号2の位置番号423、427、433、444、447のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、配列番号2の位置番号504、510、513のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、配列番号2の位置番号543、556、558のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、又は配列番号2の位置番号747、757、762、763のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマーが挙げられ、より具体的には、5'-gattgctgagtatcctggaa ccatc-3' 又は対応する相補鎖、5'-gaycctaacgacatggaaacc-3' 又は対応する相補鎖、5'-ttcwgarcctytctgaagcs-3' 又は対応する相補鎖、5'-agatgaygmkgcgcysgar-3' 又は対応する相補鎖、5'-cgacggtgaaagyagcgacag-3' 又は対応する相補鎖、5'-caatgaactgcgcggyaagtt-3' 又は対応する相補鎖、5'-gtcacgac caattcattaac-3' 又は対応する相補鎖、5'-gyytgamgcttcagawgcttgrtka-3' 又は対応する相補鎖、5'-ygargtrcgcagagtttcaacc-3' 又は対応する相補鎖、5'-catyaccaarcgytcttgg-3' 又は対応する相補鎖、及び5'-cgytcaacagacagtga



wgtc-3' 又は対応する相補鎖のいずれかで遺伝子増幅プライマーが挙げられる。

### 【0018】

ビブリオコレラ用プライマーとしては、

(1) gyrB については、配列番号3の位置番号36、39、42、45、48、51のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、配列番号3の位置番号285、291、306のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、配列番号3の位置番号384、390、399のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、配列番号3の位置番号867、873、879、882、885のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、より具体的には、5'-ggtggttaacgcgctytct-3' 及び対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5'-ycgatgaacgtgaagaagataaa-3' 及び対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5'-tgagaaagtcttccacttt-3' 及び対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5'-gttaaagtgaagactttc-3' 及び対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5'-gggtaagccwgcaagatcc-3' 及び対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマーが挙げられる。

### 【0019】

(2) rpoD については、配列番号4の位置番号93、96、105、114、115、116、117、のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、配列番号4の位置番号126、132、141のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、配列番号4の位置番号216、222、231、240のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、配列番号4の位置番号252、254、255、260、261、264のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、配列番号4の位置番号276、285、291のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子

増幅プライマー、配列番号4の位置番号327、333、342、345のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、配列番号4の位置番号424、426、432、441、445、446のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、配列番号4の位置番号448、450、453、468のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、配列番号4の位置番号489、495、501のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、配列番号4の位置番号519、522、525、540のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、配列番号4の位置番号585、591、600、603、606のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、配列番号4の位置番号639、645、654、657のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、配列番号4の位置番号679、680、681、687、702のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、配列番号4の位置番号705、708、714、720、723のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、配列番号4の位置番号729、732、741、750のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、が挙げられ、より具体的には、5'-attcttgagcagtttgatcgt-3'及び対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5'-caggccgaagagctacgtctc-3'及び対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5'-tgagctttctgaagcggatctcgcg-3'及び対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5'-gaagatgatgctgtcgctcgaa-3'及び対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5'-gaagatgaagacgaagat-3'及び対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5'-cggtatcgaccctgaa-3'及び対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5'-catcaagcttctgaagcgtcaga-3'及び対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5'-tcaac-3'及び対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5'-ccaagtggcgaattgc-3'及び対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5

‘-acggaagatatccarcactaa-3’ 及び対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5 ‘-gcgaacacgatccattgaagt-3’ 及び対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5 ‘-gatgaacgatttcttcggcatc-3’ 及び対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5 ‘-aaggactttatccagccac-3’ 及び対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5 ‘-ttcttcttgctcacggactttcgc-3’ 及び対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5 ‘-ttctgaattgaacggcgatc-3’ 及び対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5 ‘-tgtctcttgctcgatcatttgt-3’ 及び対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマーが挙げられる。

#### 【0020】

ビブリオミミカス用プライマーとしては、

(1) gyrBについては、配列番号5の位置番号36、39、42、45、48、51のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、配列番号5の位置番号285、291、306のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、配列番号5の位置番号384、390、399のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、配列番号5の位置番号867、873、879、882、885のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマーが挙げられ、より具体的には、5 ‘-ggtagtgaatgccctgtca-3’ 及び対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5 ‘-cggatgagcgtgaagaagataag-3’ 及び対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5 ‘-tgaaaaagtattccacttc-3’ 及び対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5 ‘-gttgaagtgaataactttt-3’ 及び対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5 ‘-wggcaaaccagckarrtct-3’ 及び対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマーが挙げられる。

#### 【0021】

(2) rpoDについては、配列番号6の位置番号93、96、105、114、115、116、117、のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、配列番号6の位置番号126、132、141のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる

遺伝子増幅プライマー、配列番号6の位置番号216、222、231、240のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、配列番号6の位置番号252、254、255、260、261、264のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、配列番号6の位置番号276、285、291のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、配列番号6の位置番号327、333、342、345のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー。配列番号6の位置番号424、426、432、441、445、446のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、配列番号6の位置番号448、450、453、468のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、配列番号6の位置番号489、495、501のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、位置番号519、522、525、540のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、配列番号6の位置番号585、591、600、603、606のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、配列番号6の位置番号639、645、654、657のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、配列番号6の位置番号679、680、681、687、702のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、配列番号6の位置番号705、708、714、720、723のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、配列番号6の位置番号729、732、741、750のいずれか2以上の位置の塩基を含む連続する15塩基以上の鎖又はその相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、が挙げられ、より具体的には、5 ‘-cattcttgaacagtttgacaag-3’ 及び対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5 ‘-caggcagaagaactacgtctg-3’ 及び対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5 ‘-agarctctctgaagccgatctcgct-3’ 及び対応する

相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5 ‘-gaagatgacgaggtcgcgag-3’ 及び対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5 ‘-gaggatgaagatgaagac-3’ 及び対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5 ‘-gggtattgaccctgagctc-3’ 及び対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5 ‘-taaccaagcatctgaagcttcaag-3’ 及び対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5 ‘-tcaaccaaagggtcaaattgt-3’ 及び対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5 ‘-gcggaaratatccagtaccag-3’ 及び対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5 ‘-acgaacacgatccatcgaggta-3’ 及び対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5 ‘-aataaatgatttctttggcatt-3’ 及び対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5 ‘-gagyactttatcragccat-3’ 及び対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5 ‘-gtcttcttgctcacgtactttttg-3’ 及び対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5 ‘-ttggattgaagggcgaata-3’ 及び対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマー、5 ‘-agtctcytgttcgatcatctgm-3’ 及び対応する相補鎖からなる遺伝子増幅プライマーが挙げられる。

#### 【0022】

本件発明は、これらプライマー及びプローブを他の試薬と組み合わせたビブリオコレラ又はミカスの検出、定量又は同定用のキットを包含するものである。

#### 【0023】

本発明で用いる遺伝子増幅方法は、PCR法に限定されない。プライマーの特異性に基づく特異増幅方法、あるいは増幅の特異的阻害方法に用いる事が可能である。また、同様に特異増幅プライマーと標識特異プローブの組み合わせによる定量増幅反応にも用いる事が出来る。また、プローブ配列は単独で用いる事も可能である。その使用方法是、固相あるいは液相に限定されない。サイバークリーンなどの増幅した二本鎖DNAを検出する試薬を用いて行うリアルタイムPCRやFRET等を応用したリアルタイムPCRを行う際のプライマー及びプローブとしても利用可能である。

#### 【0024】

本発明で得られた塩基配列の系統間特異性情報（図2、3、4）を用いる事によって、高特異性を有するプローブ、及び高特異性を有しかつ増幅効率に優れた遺

伝子増幅用プライマーを設計する事が可能となった。本発明で得られたビブリオコレラまたはビブリオミミカス特異的塩基情報（図2、3、4）を基に作成したPCRプライマーの配列を表2に示す。

【0025】

【表 2】

表2. *V. cholerae*, *V. mimicus* 特異検出プライマー

標的遺伝子	プライマー	配列	長さ	位置	方向
<i>gyrB</i>	CMgF	gaayctggcggtcgatcaag	22	258 - 279	センス
	CMgR	catrtagttgttcaaaagtacgg	22	564 - 543	アンチセンス
<i>rpoD</i>	CMrF	gaycctaacgacatggaacc	21	166 - 186	センス
	CMrR	gtcacgaccaaatcattaac	21	420 - 400	アンチセンス

## 【0026】

また、系統群としての情報を得ているため、解析した配列上のほぼ全長にわたって、この様な特異プライマーあるいはプローブを設計する事が可能である。

## 【0027】

以下、本発明を実施例により詳細に説明する。実施例はその1様体であり、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

## 【0028】

## 【実施例】

## [実施例1]

本発明により得られた、ビブリオコレラおよびミミカスに特異的である領域を用いて設計した表2に示された遺伝子増幅用プライマーを用いた実施例を示す。尚、請求項5の(2)、請求項5の(3)、請求項11の(2)、および請求項11の(7)に記載のプライマーはそれぞれ表2中のCMgF、CMgR、CMrFおよびCMrRに相当する。供試菌株から抽出した染色体DNAを鋳型としたPCRを行った。PCRはAmplitaq Gold(PE Applied Biosystems)を用いて、合計20 $\mu$ lの反応液で行った。サーマルサイクラーの条件は、95℃10分の加熱後に94℃1分、アニール（アニール温度は表5参照）1分、72℃1分を35サイクル行い、最後に72℃10分の伸長反応を行った。反応後のサンプルは、1%アガロースゲルで電気泳動後、臭化エチジウムで染色し紫外線照射下で遺伝子の増幅の有無を確認した。gyrB遺伝子を標的としたCMgFとCMgR、rpoD遺伝子を標的としたCMrFとCMrRのどちらの組み合わせにおいても、ビブリオコレラ及びミミカスに属するとされた菌株由来のDNAからのみ増幅産物が確認された（表6）。

## 【0029】

## [実施例2]

本発明により得られた、ビブリオコレラまたはミミカスに特異的である領域を用いて設計した表3、4に示された遺伝子増幅用プライマーを用いた実施例を示す。尚、請求項19の(1)、請求項19の(3)、請求項19の(4)、請求項19の(5)、請求項25の(1)および請求項25の(14)に記載のプライマーはビブリオコレラ特異的プライマーであって、それぞれ表3中のCF1、CF2、C



R2、CR1、CrF1およびCrR1に、さらに請求項 3 3 の ( 1 ) 、請求項 3 3 の ( 3 ) 、請求項 3 3 の ( 4 ) 、請求項 3 3 の ( 5 ) 、請求項 3 9 の ( 7 ) および請求項 3 9 の ( 1 3 ) に記載のプライマーはビブリオミミカス特異的であってそれぞれ表4中のMF1、MF2、MR2、MR1、MrF1およびMrR 1 に相当する。

**【 0 0 3 0 】**

実施例 1 と同様に、供試菌株から抽出した染色体DNAを鋳型としたPCRを行った（アニール温度は表 5 参照）。いずれの場合も、ビブリオコレラに特異的なプライマーはビブリオコレラのみを、ビブリオミミカスに特異的なプライマーはビブリオミミカスのみから増幅産物が検出された（表 6 ）。

**【 0 0 3 1 】**

【表 3】

表3. *V. cholerae*特異検出用プライマー

標的遺伝子	プライマー	配列	長さ	位置	方向
<i>gyrB</i>	CF1	ggtggttaacgcgctytct	19	33 - 51	センス
	CR2	gttaaagtgaagacttc	19	402 - 384	アンチセンス
	CF2	tgagaaagtcttccacttt	19	381 - 399	センス
	CR1	gggtaagccwgcaagatcc	19	885 - 867	アンチセンス
<i>rpoD</i>	CrF1	attcttgagcagtttgatcgt	21	97 - 117	センス
	CrR1	tctgaattgaacggcgatc	21	725 - 705	アンチセンス

【0032】

【表 4】

表4. *V. mimicus*特異検出用プライマー

標的遺伝子	プライマー	配列	長さ	位置	方向
<i>gyrB</i>	MF1	ggtagtgaatgccctgtca	19	33 - 51	センス
	MR2	gittgaagtgaatactttt	19	402 - 384	アンチセンス
	MF2	tgaaaaagtattccacttc	19	381 - 399	センス
	MR1	wggcaaaccagckarrtct	19	885 - 867	アンチセンス
<i>rpoD</i>	MrF1	taaccaagcatctgaagcttcaag	24	423 - 446	センス
	MrR1	gtcttcttgctcagctacttttg	24	702 - 679	アンチセンス

【0033】

【表 5】

表5. *V. cholerae*, *V. mimicus* 特異検出用プライマー-PCR条件

PCR条件						
標的遺伝子	センスプライマー	アンチセンスプライマー	増幅産物(bp)	アニール温度(°C)	サイクル数	プライマー濃度(μM)
<i>gyrB</i> ( <i>V. cholerae</i> , <i>V. mimicus</i> )	CMgF	CMgR	307	60	35	0.1
<i>rpoD</i> ( <i>V. cholerae</i> , <i>V. mimicus</i> )	CMrF	CMrR	255	60	35	0.1
<i>gyrB</i> ( <i>V. cholerae</i> )	CF1	CR2	370	65	35	0.1
	CF2	CR1	505	60	35	0.1
<i>rpoD</i> ( <i>V. cholerae</i> )	CrF1	CrR1	629	65	35	0.1
<i>gyrB</i> ( <i>V. mimicus</i> )	MF1	MR2	370	65	35	0.1
	MF2	MR1	505	60	35	0.1
<i>rpoD</i> ( <i>V. mimicus</i> )	MrF1	MrR1	280	65	35	0.1

【0034】

【表6】

表6. *V. cholerae*, *V. mimicus*特異検出プライマーによるPCRの実施結果

通称	名 称	株 名 称	血清型	コリナ菌素遺伝子	PCR									
					CMFACOR1	CMFACOR2	CMFACOR3	CMFACOR4	CMFACOR5	CMFACOR6	CMFACOR7	CMFACOR8	CMFACOR9	CMFACOR10
1	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 27562 T			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 29308			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 29307			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 33147			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 33148			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 33149			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 33814			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 33815			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 33816			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 33817			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	<i>V. vulnificus</i>	ATCC 43382			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	<i>V. vulnificus</i>	ATCC BAA-88			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	<i>V. vulnificus</i>	ATCC BAA-87			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	<i>V. vulnificus</i>	ATCC BAA-88			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	<i>V. vulnificus</i>	ATCC BAA-89			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	<i>V. vulnificus</i>	ATCC BAA-90			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	<i>V. vulnificus</i>	JCM 3728			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	<i>V. vulnificus</i>	JCM 3727			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	<i>V. vulnificus</i>	JCM 3728			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	<i>V. vulnificus</i>	JCM 3729			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	<i>V. vulnificus</i>	JCM 3730			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	<i>V. vulnificus</i>	JCM 3731			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	<i>V. vulnificus</i>	No.4			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	<i>V. vulnificus</i>	No.9			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	<i>V. vulnificus</i>	No.68			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	<i>V. vulnificus</i>	No.74			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	<i>V. vulnificus</i>	No.81			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	<i>V. vulnificus</i>	No.130			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	<i>V. vulnificus</i>	No.196			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	<i>V. vulnificus</i>	No.202			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	<i>V. vulnificus</i>	No.496			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	<i>V. vulnificus</i>	No.965			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	<i>V. cholerae</i>	DU1	monO1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
34	<i>V. cholerae</i>	DU2	O1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
35	<i>V. cholerae</i>	DU3	O1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

通番	名 称	株 名 称	血清型	コレラ毒素遺伝子	CMF&CMPr	CMF&CMR	CFIAOR2	CF2LOR1	OF1&OR1	MF1&MR2	MF2&MR1	MF1&MR1
36	<i>V. cholerae</i>	DU6	O1	+	+	+	+	+	+	-	-	-
37	<i>V. cholerae</i>	DU19	O1	+	+	+	+	+	+	-	-	-
38	<i>V. cholerae</i>	DU83	nonO1	+	+	+	+	+	+	-	-	-
39	<i>V. cholerae</i>	DU81	O1	+	+	+	+	+	+	-	-	-
40	<i>V. cholerae</i>	DU94	O1	+	+	+	+	+	+	-	-	-
41	<i>V. cholerae</i>	T2	nonO1	+	+	+	+	+	+	-	-	-
42	<i>V. cholerae</i>	T6	nonO1	+	+	+	+	+	+	-	-	-
43	<i>V. cholerae</i>	T97	nonO1	+	+	+	+	+	+	-	-	-
44	<i>V. cholerae</i>	T98	O1	+	+	+	+	+	+	-	-	-
45	<i>V. cholerae</i>	T116	nonO1	+	+	+	+	+	+	-	-	-
48	<i>V. cholerae</i>	NM20	nonO1	+	+	+	+	+	+	-	-	-
47	<i>V. cholerae</i>	NM26	O1	+	+	+	+	+	+	-	-	-
48	<i>V. cholerae</i>	NM48	O1	+	+	+	+	+	+	-	-	-
49	<i>V. cholerae</i>	NM67	nonO1	+	+	+	+	+	+	-	-	-
50	<i>V. cholerae</i>	NM84	nonO1	+	+	+	+	+	+	-	-	-
51	<i>V. cholerae</i>	NM85	nonO1	+	+	+	+	+	+	-	-	-
52	<i>V. cholerae</i>	Q37	O1	+	+	+	+	+	+	-	-	-
53	<i>V. cholerae</i>	Q57	O1	+	+	+	+	+	+	-	-	-
54	<i>V. cholerae</i>	Q59	nonO1	+	+	+	+	+	+	-	-	-
55	<i>V. cholerae</i>	Q86	nonO1	+	+	+	+	+	+	-	-	-
56	<i>V. cholerae</i>	Q70	nonO1	+	+	+	+	+	+	-	-	-
57	<i>V. cholerae</i>	Q80	nonO1	+	+	+	+	+	+	-	-	-
58	<i>V. cholerae</i>	K47	nonO1	+	+	+	+	+	+	-	-	-
59	<i>V. cholerae</i>	OPC24	nonO1	+	+	+	+	+	+	-	-	-
60	<i>V. cholerae</i>	OPC39	nonO1	+	+	+	+	+	+	-	-	-
61	<i>V. cholerae</i>	OPC50	O1	+	+	+	+	+	+	-	-	-
62	<i>V. mimicus</i>	ATCC 33563 T		-	+	+	-	-	-	+	+	+
63	<i>V. mimicus</i>	ATCC 33854		-	+	+	-	-	-	+	+	+
64	<i>V. mimicus</i>	ATCC 33855		+	+	+	-	-	-	+	+	+
65	<i>V. mimicus</i>	ATCC 700328		+	+	+	-	-	-	+	+	+
66	<i>V. diazotrophicus</i>	ATCC 33466 T			-	-	-	-	-	-	-	-
67	<i>V. navarensis</i>	ATCC 51183 T			-	-	-	-	-	-	-	-
68	<i>V. metschnikovii</i>	ATCC 700040 T			-	-	-	-	-	-	-	-
69	<i>V. cincinnatiensis</i>	ATCC 35912 T			-	-	-	-	-	-	-	-
70	<i>V. ordalii</i>	NCIMB 2187 T			-	-	-	-	-	-	-	-
71	<i>Listonella anguillarum</i>	NCIMB 6 T			-	-	-	-	-	-	-	-
72	<i>V. alginolyticus</i>	IFO 15630 T			-	-	-	-	-	-	-	-

通番	名 称	株 名 称	血清型	コレラ毒素遺伝子	CMF&CMR	CMF&CMR	CF1&CR2	CF2&CR1	CF1&CR1	MF1&MR2	MF2&MR1	MF1&MR1
73	<i>V. campbellii</i>	IFO 15631 T			-	-	-	-	-	-	-	-
74	<i>V. carchariae</i>	IFO 15632 T			-	-	-	-	-	-	-	-
75	<i>V. harveyi</i>	IFO 15634 T			-	-	-	-	-	-	-	-
76	<i>V. nereis</i>	IFO 15637 T			-	-	-	-	-	-	-	-
77	<i>V. parahaemolyticus</i>	IFO 12711 T			-	-	-	-	-	-	-	-
78	<i>V. proteolyticus</i>	IFO 13287 T			-	-	-	-	-	-	-	-
79	<i>V. tubiashii</i>	IFO 15644 T			-	-	-	-	-	-	-	-
80	<i>Vibrio</i> sp.	V11			-	-	-	-	-	-	-	-
81	<i>Vibrio</i> sp.	V41			-	-	-	-	-	-	-	-
82	<i>Shewanella</i> sp.	V52			-	-	-	-	-	-	-	-
83	<i>Vibrio</i> sp.	V65			-	-	-	-	-	-	-	-
84	<i>Vibrio</i> sp.	V70			-	-	-	-	-	-	-	-
85	<i>V. hollliae</i>	ATCC 33564 T			-	-	-	-	-	-	-	-

【0035】

【発明の効果】

本件発明のgyrBおよびrpoD遺伝子プライマー及びプローブは、ビブリオコレラおよびビブリオミミカスの系統関係を把握した上で設計したものであるため、特異性を向上させる検討が行われており、検出精度という点で優れている。従って、食品、臨床検体などから菌を単離せず、近縁最近種が混雑している状況で直接検出する場合に有利になる。

【 0 0 3 6 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Nichirei Corporation

<120> Primers and probes for detection of vibrio cholera or vibrio mimic  
us and method of using thereof

<130> P02-0366

<140>

<141>

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 885

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Consensus sequence of vibrio c  
holera and vibrio mimicus -gyrB

<400> 1

```
gtmtccggyg gtctrcacgg ggtaggtgtg tcggttrgtka aygcsctbtc wgaaaaagtg 60
ctrctbacca tytatcgygg yggcaaraty caywscsaaa cttaccatca ygggtgtgcca 120
caagcacctg tgkctgtrgt rggtgagakw gagcgtaccg gtactaccgt acgttttctgg 180
ccwagygcac aracytttac caatatcgaa ttycattacg acattytggc taaacgyctg 240
cgtgagctgt cattcctgaa ytctggcgtg tcgatcaagc tgaysgatga rcgtgaagaa 300
gataaraaag accacttyat gtatgaaggk ggtattcaag cgtttgtkac ccacttgaac 360
cgaaayaaaa cgccratcca tgaraaagtm ttccacttya accaagagcg tgaagatggc 420
atcagcgtgg aagtggcrat gcagtggaa y gatggtttcc aagaaaacat ctactgcttt 480
acyaacaaca tyccacagcg tgatggyggg acccayttag cyggtttccg tgggtgcrttg 540
acccgtactt tgaacaacta yatggayaaa gaaggcttct cgaagaaagc scaagcrgca 600
acctcgggtg atgatgcgcg tgaaggctta acrgcdgtkg tdtcggtgaa agtrccrgat 660
cctaaattct cragccaaac caaagataag ctrgtttctt cggargtraa atccgcrgtt 720
gartcagcya tgaatgagaa gctggcrgat ttcttrgcgg aaaaccaag cgaagcgaaa 780
aacgtttgtt cgaagattat tgatgcrgcr cghgckcgtg aagcvgcgcg taaagcmcgk 840
gaaatgacyc gycgtaaagg cgcgytrgay ythgcwgggt trcch 885
```

<210> 2

<211> 822

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Consensus sequence of vibrio c

holera and vibrio mimicus -rpoD

<400> 2

```
acacgtgaag gygaaatcga tattgccaag cgcattgaag atggtattaa ccaagttcaa 60
agtgcgattg ctgagtatcc tggaaccatc ccwtayattc ttgarcagtt tgaymrkgtt 120
caggcmgaag arctacgtct sactgayctg atttcwggtt tcgttgaycc taacgacatg 180
gaaaccgaag cgccaacygc kactcacatc ggttcwgarc tytctgaagc sgatctcgck 240
gatgaagatg aygmkgtcgy sgargatgaa gacgargatg aagaygaaga yggcgacggg 300
gaaagyagcg acagcgaaga agaagtsagg atygaccctg arctsgctcg tgagaaattc 360
aatgaactgc gcggyaagtt ccaaaacctg caattagcgg ttaatgaatt tggctcgtgac 420
agtmaycaag cwtctgaagc ktcarrcytr gtrytgata tyttccgyga attccgycta 480
acaccaaarc aattygacca yttggttgaa actctgcgya cytcratgga tcgtgttcgy 540
accaagarc gyttggtrat gaaagcvgr gttgaagtcg cgaaratgcc raagaaatcr 600
ttyatygcyc trtttacagg caatgaatcg aatgargart ggctbgataa agtvctygct 660
tctgayaarc ctaygtasm raaagtmcgt gagcaagaag amgakatycg ccgytcaaty 720
caraaactdc aratgatcga rcargagacw tcaactgtctg ttgarcgyat caaagacatc 780
agccgtcgta tgcwatcgg tgargcraaa gctcgccgtg cg 822
```

<210> 3

<211> 822

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Consensus sequence vibrio cholera-*gyrB*

<400> 3

acacgtgaag gygaaatcga tattgccaag cgcatgaag atggtattaa ccaagttcaa 60  
agtgcgattg ctgagtatcc tggaaccatc ccwtayattc ttgarcagtt tgaymrkgtt 120  
caggcmgaag arctacgtct sactgayctg atttcwggtt tcgttgaycc taacgacatg 180  
gaaaccgaag cgccaacygc kactcacatc gggttcwgarc tytctgaagc sgatctcgck 240  
gatgaagatg aygmkgtcgy sgargatgaa gacgargatg aagaygaaga yggcgacggg 300  
gaaagyagcg acagcgaaga agaagtsagg atygacctg arctsgctcg tgagaaattc 360  
aatgaactgc gcggyaagtt ccaaaacctg caattagcgg ttaatgaatt tggctcgtgac 420  
agtmaycaag cwtctgaagc ktcarrcytr gtrytgata tyttccgyga attccgycta 480  
acaccaaarc aattygacca yttggttgaa actctgcgya cytcratgga tcgtgttcgy 540  
accaagarc gyttggtrat gaaagcvgtr gttgaagtcg cgaaratgcc raagaaatcr 600  
ttyatygcyc trtttacagg caatgaatcg aatgargart ggctbgataa agtvctygct 660  
tctgayaarc ctaygtasm raaagtmcgt gagcaagaag amgakatygc ccgytcaaty 720  
caraaactdc aratgatcga rcargagacw tcaactgtctg ttgarcgyat caaagacatc 780  
agccgtcgta tgtcwatcgg tgargcraaa gctcgccgtg cg 822

<210> 4

<211> 822

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Consensus sequence of vibrio c  
holera -rpoD

<400> 4

acacgtgaag gtgaaatcga tattgccaag cgcatgaag atggtattaa ccaagttcaa 60  
agtgcgattg ctgagtatcc tggaaccatc ccttatattc ttgagcagtt tgatcgtggt 120  
caggccgaag agctacgtct cactgacctg atttcagggt tcgttgaycc taacgacatg 180

gaaaccgaag cgccaaccgc gactcacatc ggttctgagc tttctgaagc ggatctcgcg 240  
gatgaagatg atgctgtcgt cgaagatgaa gacgaagatg aagacgaaga tggcgacggg 300  
gaaagcagcg acagcgaaga agaagtcggg atcgaccctg aactggctcg tgagaaattc 360  
aatgaactgc gcggyaagtt ccaaaacctg caattagcgg ttaatgaatt tggtcgtgac 420  
agtcatcaag cttctgaagc gtcagactta gtgytggata tcttccgtga attccgycta 480  
acaccaaagc aattcgacca cttggttgaa actctgcgca cttcaatgga tcgtgttcgc 540  
acccaagaac gtttggttat gaaagcggta gttgaagtcg cgaagatgcc gaagaaatcg 600  
ttcatcgccc tatttacagg caatgaatcg aatgaagagt ggctggataa agtccttgct 660  
tctgacaagc cttacgtagc gaaagtccgt gagcaagaag aagagatccg ccgttcaatt 720  
cagaaactac aaatgatcga gcaagagaca tcaactgtctg ttgaacgcat caaagacatc 780  
agccgtcgta tgtcaatcgg tgaggcraaa gctcgccgtg cg 822

<210> 5

<211> 885

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Consensus sequence of vibrio m  
imicus -gyrB

<400> 5

gtctccgggtg gtctacacgg ggtaggtgtg tcggtagtga atgccctgtc agaaaaagtg 60  
ctgctbacca tttatcgtgg tggcaagatt cacacccaaa cttaccatca cggtgtgcca 120  
caagcaccgt tgtctgtrgt gggtagagact gagcgtaccg gtactaccgt acgtttcttg 180  
cctagtgcac agacttttac caatatcgaa ttccattacg acattctggc taaacgyctg 240  
cgtgagctgt cattcctgaa ctctggcgtg tcgatcaagc tgacggatga gcgtgaagaa 300  
gataagaaag accacttyat gtatgaaggt ggtattcaag cgtttgtkac ccacttgaac 360

cgtaayaaaa cgccgatcca tgaaaaagta ttccacttca accaagagcg tgaagatggc 420  
 atcagcgtgg aagtggcaat gcagtggaac gatggtttcc aagaaaacat ctactgcttt 480  
 accaacaaca tyccacagcg tgatggcggg acccacttag cyggtttccg tgggtgcrttg 540  
 acccgtactt tgaacaacta catggacaaa gaaggcttct cgaagaaagc scaagcrgca 600  
 acctcgggtg atgatgcgcg tgaaggctta acrgcrgtkg tkcgggtgaa agtrccrgat 660  
 cctaaattct cragccaaac caaagataag ctrgtttctt cggargtgaa atccgcgggt 720  
 gagtcagcca tgaatgagaa gctggcggat ttcctggcgg aaaaccaag cgaagcgaaa 780  
 aacgtttgtt cgaagattat tgatgcrgcr cghgctcgtg aagcvgcgcg taaagcacgt 840  
 gaaatgacyc gtcgtaaagg cgcgctagay ytmgtggtt tgccw 885

<210> 6

<211> 822

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: consensus sequence of vibrio m  
imicus -rpoD

<400> 6

acacgtgaag gcgaaatcga tattgccaag cgcattgaag atggtattaa ccaagttcaa 60  
 agtgcgattg ctgagtatcc tggaaccatc ccatacatc ttgaacagtt tgacaagggt 120  
 caggcagaag aactacgtct gactgayctg atttctggtt tcgttgatcc taacgacatg 180  
 gaaaccgaag cgccaactgc tactcacatc ggttcagarc tctctgaagc cgatctcgtc 240  
 gatgaagatg acgaggtcgc ggaggatgaa gacgaggatg aagatgaaga cggcgacggg 300  
 gaaagyagcg acagcgaaga agaagtgggt attgacctg agctcgctcg tgagaaattc 360  
 aaagaaactgc gcggaagtt caaaacctg caattagcgg ttaatgaatt tggctcgtgac 420  
 agtaaccaag catctgaagc ttcaagcctg gtactggata tyttccgcga attccgccta 480

```

acaccaaacc aatttgacca tttggttgaa actctgcgta cctcgatgga tcgtgttcgt 540
acccaagagc gyttagtgat gaaagcvgtg gttgaagtcg cgaaaatgcc aaagaaatca 600
tttattgcyc trtttacagg caatgaatcg aatgargaat ggctygataa agtrctcgct 660
tctgataarc cttatgtaca aaaagtacgt gagcaagaag acgatattcg ccgctcaatc 720
caaaaactkc agatgatcga acargagact tcactgtctg ttgagcgtat caaagacatc 780
agccgtcgta tgtctatcgg tgaagcgaaa gctcgccgtg cg 822

```

### 【図面の簡単な説明】

#### 【図 1】

gyrBおよびrpoD遺伝子の部分配列を繋ぎ合わせた後に分子系統解析を行った結果を示した図。この図が近隣結合法による分子系統樹であり、ビブリオコレラ及びミミカスが他のビブリオ属細菌とは異なった単一の系統に属していることを示している。さらに、ビブリオコレラ及びミミカスもそれぞれが独立した系統群を形成していることを示している。

#### 【図 2】

図1で示したビブリオコレラおよびミミカスが属するクラスターのgyrB遺伝子のコンセンサス配列（上段）と近縁のクラスター（図1中のC1, 2, 3）のgyrB遺伝子のコンセンサス配列（下段）を決定し比較した図。●で示した部位がビブリオコレラおよびミミカスに特異的な塩基であることを示す。

#### 【図 3】

図1で示したビブリオコレラおよびミミカスが属するクラスターのrpoD遺伝子のコンセンサス配列（上段）と近縁のクラスター（図1中のC1, 2, 3）のrpoD遺伝子のコンセンサス配列（下段）を決定し比較した図。●で示した部位がビブリオコレラおよびミミカスに特異的な塩基であることを示す。

#### 【図 4】

図1で示したビブリオコレラが属するクラスターのgyrB遺伝子のコンセンサス配列（上段）とミミカスが属するクラスターのgyrB遺伝子のコンセンサス配列（下段）を決定し比較した図。●で示した部位がビブリオコレラに特異的な塩基であることを示す。

## 【図 5】

図1で示したビブリオコレラが属するクラスターのrpoD遺伝子のコンセンサス配列（上段）とミミカスが属するクラスターのrpoD遺伝子のコンセンサス配列（下段）を決定し比較した図。●で示した部位がビブリオコレラに特異的な塩基であることを示す。

## 【図 6】

図1で示したビブリオミミカスが属するクラスターのgyrB遺伝子のコンセンサス配列（上段）とビブリオコレラが属するクラスターのgyrB遺伝子のコンセンサス配列（下段）を決定し比較した図。●で示した部位がビブリオミミカスに特異的な塩基であることを示す。

## 【図 7】

図1で示したビブリオミミカスが属するクラスターのrpoD遺伝子のコンセンサス配列（上段）とビブリオコレラが属するクラスターのrpoD遺伝子のコンセンサス配列（下段）を決定し比較した図。●で示した部位がビブリオミミカスに特異的な塩基であることを示す。

【書類名】 図面

【図 1】

図1. *gyrB+rpoD*配列による分子系統樹



【図 2】

VCVM-gyrB.con 3,4,5,gyrB.con	1	GTHTCCGGTGGTCTTCACCGGTTAGGTGTGTCGGTGTGTAAYGCSC7B7CNGAAAAAGTG	60
	1	..H..N..T..YY...Y..C..N..K..X..N..B..Y..C..VY.D.....D	60
VCVM-gyrB.con 3,4,5,gyrB.con	61	CTRCTBACCATTYATCGYGGYGGCAARATYCAWNCSCAAACTTACCATCAYGGTGTGCCA	120
	61	Y.DY..B..Y...Y..Y...RR...HVMH.YB...A.W...B..YYGY...B..D..W	120
VCVM-gyrB.con 3,4,5,gyrB.con	121	CAAGCACCGTTGKCTGTGTGTGCTGACACWGAUGCGTACCGGTACTACCGTACGTTTCTGG	180
	121	.....B..VY.RRSB..K..B..W..D..B..WHRH..H..D..W..VB.D..Y..Y...	180
VCVM-gyrB.con 3,4,5,gyrB.con	181	CCWAGYGCACARACYTTTACCAATATCGAATTTCATTACGACATTTTGGCTAAACGYCTG	240
	181	..R..T..HG.V..B..Y....Y..Y....C..Y..Y..H....D....R...Y..R	240
VCVM-gyrB.con 3,4,5,gyrB.con	241	CGTGAGCTGTCTTCTCTCAAYTCTGGCGTGTGATCAAGCTGAYBGATGARGCTGAAGAA	300
	241	..Y..R..B..W..YY.A..C..W..B..H..V..YHRWY.RHW...H....MR	300
VCVM-gyrB.con 3,4,5,gyrB.con	301	GATAAARAAGACCACTTATGTATGAAGGKGGTATTCAAGCGTTTGTACCCACTTGAAC	360
	301	..Y..AM..M..Y..Y....XR.....K..YMR...R..Y...RSY..YY.H..Y	360
VCVM-gyrB.con 3,4,5,gyrB.con	361	CGYAAATAAAGCCCRATCCATGARAAGTMTTCCACTTYAACCAAGAGCGTGAAGATGGC	420
	361	..C.....X..S..Y....V.....R.....Y....RYMN..V....M..Y..B	420
VCVM-gyrB.con 3,4,5,gyrB.con	421	ATCAGCGTGGAAAGTGGCBATGCAAGTGAAYGATGGTTTCCAGAAAACATCTACTGCTTT	480
	421	..YWSY..K....V..V....R.....Y..Y.....RRY..Y....Y...	480
VCVM-gyrB.con 3,4,5,gyrB.con	481	ACYAACAACATYCCACAGCGTGATGGYGGTACCCAYTTAGCYGGTTCCGTGGTGCRTTG	540
	481	..C..Y..Y....W..R....Y.....B..DR.H..C.....S..D....Y..SH...Y..R	540
VCVM-gyrB.con 3,4,5,gyrB.con	541	ACCCGTACTTTGAACAACTAYATGGAYAAAGAGGCTTCTCGAAGAAAGCSCAAGCRGCA	600
	541	..K..W..BY..H..Y..C..W.....W..R.....S..WYNS..R.....M..R..VK..G	600
VCVM-gyrB.con 3,4,5,gyrB.con	601	ACCTCGGGTGATGATGCGCGTGAAGGCTTAACRGCDGTGKGTDTCCGTGAAAAGTRCCRGAT	660
	601	..V..R..Y..Y....K.....Y..R..N..V..B..Y..D..B....K..D...	660
VCVM-gyrB.con 3,4,5,gyrB.con	661	CCTAAATTCTCRAGCCAAACCAAGATAAGCTGTCTTCTCGGARGTAAATCCTGCRGTT	720
	661	..W..R....H.....Y....Y..AY....B..W..Y....O..RD..K....K	720
VCVM-gyrB.con 3,4,5,gyrB.con	721	GARTCAGCTATGAATGAGAAGCTGGCGGATTTCTTGTGCGGAAACCCAAAGCGAAGCGAAA	780
	721	....D..R...GGY..R..RY.BRMB..K..YY....H..RM..Y..HWST....N...	780
VCVM-gyrB.con 3,4,5,gyrB.con	781	AACGTTTGTTCGAAGATTATTGATGCRGCRGCGHCKCGTGAAGCVGCGCGTAAAGCMCGK	840
	781	..YS..S...WSH..A..Y..Y....V..W..W..H..Y.....V.....B..T	840
VCVM-gyrB.con 3,4,5,gyrB.con	841	GAAATGACTCGYCGTAAAGCGCGYTRGAYYTHGCGGYYTTCCH	895
	841	..R.....N..T.....B..R..V...C..KR....TY..D..E	895

図2. *V. cholerae*, *V. mimicus*のgyrB遺伝子塩基配列特異性情報

【図3】

VCVM-rpoD.con	1	ACACGTGAAGGYGAAATCGATATTGCCAAGCGCATTGAAGATGGTATTAAACCAAGTTCAA	60
3,4,5-rpoD.con	1	..T..Y.....T..B..Y.....Y..K..R..Y..Y.....N.....Y.....W...	60
VCVM-rpoD.con	61	AGTCCGATTGCTGAGTATCCTGGAACCATCCCTATATCTTGCARCAAGTTGAYHKGTT	120
3,4,5-rpoD.con	61	M.Y..HG.K.....A..Y..H..H..N..T.....YY.W.....R..Y..AAA...	120
VCVM-rpoD.con	121	CAGGCMGAAGARCTACGCTCTGACTGAYCTGATTTTCWGGTTTCGTTGAYCCTAACGACATG	180
3,4,5-rpoD.con	121	.WW..W..R...Y.W..YY.A..M...M.V..YWSH.....YR.H.....DR.YXHWGWT	180
VCVM-rpoD.con	181	GAAACCGAAGCGCCAACTGCKACTCACATCGGTTTCWGARTTCTGAAGCGATCTCGCK	240
3,4,5-rpoD.con	181	.V.RBDRMN..N.....D..R..N..Y.....Y..A...Y.DR.HRGYK.W..Y..R.MT	240
VCVM-rpoD.con	241	GATGAAGATGAYGKCTCCYSGARGATGAAGACGARGATGAAGAYGAAGAYGGCGACGGT	300
3,4,5-rpoD.con	241	..Y..H..YAGTHAM.AYM.Y..YSWY.....Y..W..Y..V...RM...R.Y..HRRC	300
VCVM-rpoD.con	301	GAAAGYAGCGACAGCGAAGAAAGTGGTATYGAACCTGARGCTGGCTCGTGAGAAATTC	360
3,4,5-rpoD.con	301	AGCRM.EVVRKYMY.....DRYH..H..C..Y.....X..DYTA..R.....Y	360
VCVM-rpoD.con	361	AATGAACCTGCGCGYAAAGTCCAAAACCTGCAATTAGCGGTTAATGAATTTGGTCTGAC	420
3,4,5-rpoD.con	361	.CY..RY.W..YAA.M.R.AY..RR.YY.W..RY.H..KAWH..Y..RCAY..YDAYR.B	420
VCVM-rpoD.con	421	AGTMAYCAAGCWTCTGAAGCKTCARRCTYTRGTRYTGATATYTTCCGYGAATTCGGYCTA	480
3,4,5-rpoD.con	421	..CHMHAM.R.YSMNS...NW.YGAR..DR...VRMR.....R..Y..HY.V	480
VCVM-rpoD.con	481	ACACCAARCAATTYGACCAYTTGGTTGAAACTCTGCGYACTTCRATGATCGTGTTTCGY	540
3,4,5-rpoD.con	481	..R..D.....R.....YY..Y.H..HRMY.MR..DM...M...W...W..Y..D...	540
VCVM-rpoD.con	541	ACCCAAGARCOYTTGGTATGAAAGCVGTRGTTGAAGTCGCGAARATGCCRAAGAAATCR	600
3,4,5-rpoD.con	541	..W.....A...Y..A.C...HRVD.K.YK..Y...DWM.SK.....X..R..R..A	600
VCVM-rpoD.con	601	TTYATYGCYCTRTTTACAGGCAATGAATCGAATGARGAHTGGCTBGATAAAGTVCTYCT	660
3,4,5-rpoD.con	601	.....K.VB.M..Y..Y..Y.....DRRY..W.CN...Y.W..YS..R.HM...D	660
VCVM-rpoD.con	661	TCTGAYAAACCTTAYGTASHRAAAGTMCGTGAGCAAGAAGANGAKATYCGCCGYTCAATY	720
3,4,5-rpoD.con	661	W.M..W.....W...YWG.M..RA.YH.HSHVV.W.....RRHB.....T...W...	720
VCVM-rpoD.con	721	CARAACTDCARATGATCGARCARGAGACWTCACTGTCTGTTGARGCYATCAAAGACATC	780
3,4,5-rpoD.con	721	..W..RY.RMEW..B..Y...S.A..A..V..WY.HRNK..BRRHR...Y.....Y..Y	780
VCVM-rpoD.con	781	AGCCGTCTATGTCNATCGGTGARGCRAAGCTCGCCGTGCG	822
3,4,5-rpoD.con	781	.....Y..C.....Y.....A..K.....Y..W...	823

図3. *V. cholerae*, *V. mimicus*のrpoD遺伝子塩基配列特異性情報

【図 4】

gyrB-VC.con	1	GTMTCCGGYGGTCTGCACGGGCTAGGTGTGTCGGTGGTTAACGGCTYTCGAAAAAGTG	60
gyrB-VH.con	1	..C....T....A.....A..G..T..C..G..A.....	60
gyrB-VC.con	61	CTRCTYACCATYTTATCGYGGYGGCAABATCCAYWCSCAAACTTACCATCATGGTGTGCCA	120
gyrB-VH.con	61	..G..B....T....T....G..T..CA..C.....C.....	120
gyrB-VC.con	121	CAAGCACCGTTGGCTGTGTGTGTGAGACGAGCGTACCGGTACTACCGTACGTTTCTGG	180
gyrB-VH.con	121	.....T.....G.....G..T.....	180
gyrB-VC.con	181	CCWAGYGCACARACYTTTACCAATATCGAATTTCATTACGACATTTGGCTAAACGCCTG	240
gyrB-VH.con	181	..T..T....G..T.....C.....C.....Y...	240
gyrB-VC.con	241	CGTGAGCTGTCTATTCTGAAATCTGGCGTGTGATCAAGCTGAYCGATGAACGTGAAGAA	300
gyrB-VH.con	241	.....C.....CG.....G.....	300
gyrB-VC.con	301	GATAAAAAGACCACCTTCATGTATGAAGGGGTATTCAAGCGTTTGTGACCCACTTGAAC	360
gyrB-VH.con	301	.....G.....Y.....T.....K.....	360
gyrB-VC.con	361	CGYAYAAAAACGCGCATCCATGAGAAAGTCTCCACTTTAACCAAGAGCGTGAAGATGGC	420
gyrB-VH.con	361	..T.....G.....A.....A.....C.....	420
gyrB-VC.con	421	ATCAGCGTGGAAAGTGGCGATGCGAGTGAAYGATGGTTTCCAAGAAAACATCTACTGCTTT	480
gyrB-VH.con	421	.....A.....C.....	480
gyrB-VC.con	481	ACYAACAACATCCACAGCGTGATGGTGGTACCCAYTTAGCCGGTTTCCGTGGTCCGTTG	540
gyrB-VH.con	481	..C.....Y.....C.....C.....Y.....R...	540
gyrB-VC.con	541	ACCCGTACTTTGAACAACATAYATGGAYAAAGAAGGCTTCTCGAAGAAAGCSCAAGCGGCA	600
gyrB-VH.con	541	.....C.....C.....R.....	600
gyrB-VC.con	601	ACCTCGGGTGATGATGCGCGTGAAGGCTTAACGGCWGTGTTTCGGTGAAAGTCCGGAT	660
gyrB-VH.con	601	.....R..R..K..K.....R..R...	660
gyrB-VC.con	661	CCTAAATCTCTCAGCCAAACCAAGATAAGCTGTTTCTTCGGAAAGTAAATCCGCRGTT	720
gyrB-VH.con	661	.....R.....R..G.....G...	720
gyrB-VC.con	721	GARTCAGCYATGAATGAGAAGCTGGCGGATTTCTTAGCGGAAAACCAAGCGAAGCGAAA	780
gyrB-VH.con	721	..G....C.....G.....G.....	780
gyrB-VC.con	781	AACGTTTGTTCGAAGATTATTGATGCGCGCGYGCXCGTGAAGCGCGCGTAAAGCCCGK	840
gyrB-VH.con	781	.....H..T.....V.....A..T	840
gyrB-VC.con	841	GAAATGACTCGYCGTAAAGGCGCGYTGATCTTGCNNGCTTACCC	885
gyrB-VH.con	841	.....Y..T.....C..A..YY..H..T..T..G..W	885

図4. *V. cholerae*のgyrB遺伝子塩基配列特異性情報

【図 5】

rpoD-VC.con	1	ACACGTGAAGGTGAAATCGATATTGCCAAGCGCATTGAAGATGGTATTAAACCAAGTTCAA	60
rpoD-VH.con	1	.....C.....	60
rpoD-VC.con	61	AGTGGCATTGCTGAGTATCCTGGAACCATCCCTTATATCTTGAGCAGTTTGATCGTGT	120
rpoD-VH.con	61	.....A..C.....CAAG...	120
rpoD-VC.con	121	CAGGCCGAAGAGCTACGTCTCACTGACCTGATTTTCAGTTTCGTTGAYCCTAACGACATG	180
rpoD-VH.con	121	....A....A.....G....Y.....T.....T.....	180
rpoD-VC.con	181	GAAACCGAAGCGCCAACCGCGACTCACATCGGTTCTGAGCTTCTGAAGCGGATCTCGCG	240
rpoD-VH.con	181	.....T..T.....A..R..C.....C.....T	240
rpoD-VC.con	241	GATGAAGATGATGCTGCTGCTCGAAGATGAAGACGAAGATGAAGACGAAGATGGCGACGGT	300
rpoD-VH.con	241	.....C..AG....CG..G.....G.....T.....C.....	300
rpoD-VC.con	301	GAAAGCAGCGACAGCGAAGAAGAAGTCCGGTATCGACCCTGAACCTGGCTCGTGAGAAATTC	360
rpoD-VH.con	301	.....Y.....G.....T.....G..C.....	360
rpoD-VC.con	361	AATGAATCGCGGGYAAAGTTCCAAAACCTGCAATTAGCGGTTAATGAATTTGGTCGTGAC	420
rpoD-VH.con	361	.....C.....	420
rpoD-VC.con	421	AGTCATCAAGCTTCTGAAGCGTCAAGCTTAGTGYTGGATATCTTCCGTGAATTCGGYCTA	480
rpoD-VH.con	421	....A.C....A.....T...AG.C.G..AC.....Y.....C.....	480
rpoD-VC.con	481	ACACCAAAGCAATTGACCACTTGGTTGAAACTCTGCGCACTTCAATGGATCGTGTTCGC	540
rpoD-VH.con	481	.....A.....T.....T.....T..C..G.....T	540
rpoD-VC.con	541	ACCCAAGAACGTTTGGTRATGAAAGCGGTAGTTGAAGTCGCGAAGATGCCGAAGAAATCG	600
rpoD-VH.con	541	.....G..Y....G.....V..G.....A....A.....A	600
rpoD-VC.con	601	TTCAATCGCCCTATTTACAGGCAATGAATCGAATGAAGAGTGGCTGGATAAAGTCCTTGCT	660
rpoD-VH.con	601	..T..T..Y..R.....R..A.....Y.....R..C..	660
rpoD-VC.con	661	TCTGACAAAGCCTTACGTAGCGAAGTCCGTGAGCAAGAAGAAGAGATCCGCCGTTCAATT	720
rpoD-VH.con	661	....T..R....T...CAA....A.....C..T..T....C....C	720
rpoD-VC.con	721	CAGAACTACAAATGATCGAGCAAGAGACATCACTGTCTGTTGAACGCATCAAAGACATC	780
rpoD-VH.con	721	..A....K..G.....A..R....T.....G..T.....	780
rpoD-VC.con	781	AGCCGTCGTATGTCAATCGGTGAGGCRAAAGCTCGCCGTGCG	822
rpoD-VH.con	781	.....T.....A..G.....	822

図5. *V. cholerae*のrpoD遺伝子塩基配列特異性情報

【図 6】

gyrB-VH.con	1	GTCTCCGGTGGTCTACACGGGGTAGGTGTGTCGGTAGTGAATGCCCTGTACAGAAAAAGTG	60
gyrB-VC.con	1	..M....Y....G.....G..T..C..G..Y..T.....	60
gyrB-VH.con	61	CTGCTBACCATTTATCGTGGTGGCAAGATTACACCCAAACTTACCATCACGGTGTGCCA	120
gyrB-VC.con	61	..R..Y....Y....Y..Y....R..C..YW.S.....T.....	120
gyrB-VH.con	121	CAAGCACCGTTGTCTGTRGTGGGTGAGACTGAGCGTACCGGTACTACCGTACGTTTCTGG	180
gyrB-VC.con	121	.....G.....R.....K..W.....	180
gyrB-VH.con	181	CCTAGTGCACAGACTTTTACCAATATCGAATTCCATTACGACATTCTGGCTAAACGYCTG	240
gyrB-VC.con	181	..W..Y....R..Y.....Y.....T.....C....	240
gyrB-VH.con	241	CGTGAGCTGTCTTCTGAACTCTGGCGTGTGATCAAGCTGACGGATGACCGTGAAGAA	300
gyrB-VC.con	241	.....Y.....YC.....A.....	300
gyrB-VH.con	301	GATAAGAAAGACCACCTTYATGTATGAAGGTGGTATTCAAGCGTTTGTACCCACTTGAAC	360
gyrB-VC.con	301	.....A.....C.....G.....G.....	360
gyrB-VH.con	361	CGTAAYAAAACGCCGATCCATGAAAAGTATTCCACTTCAACCAAGAGCGTGAAGATGGC	420
gyrB-VC.con	361	..Y.....R.....G.....C.....T.....	420
gyrB-VH.con	421	ATCAGCGTGGAAAGTGGCAATGCAGTGGAAACGATGGTTTCCAAGAAAACATCTACTGCTTT	480
gyrB-VC.con	421	.....R.....Y.....	480
gyrB-VH.con	481	ACCAACAACATYCCACAGCGTGTGGGTACCCACTTAGCYGGTTTCCGTGGTGCRTTG	540
gyrB-VC.con	481	..Y.....C.....T.....Y.....C.....G...	540
gyrB-VH.con	541	ACCCGTACTTTGAACAACATACATGGACAAAGAAGGCTTCTCGAAGAAAGCSCAAGCRGCA	600
gyrB-VC.con	541	.....Y.....Y.....G.....	600
gyrB-VH.con	601	ACCTCGGGTGATGATGCGCGTGAAGGCTTAACRGCRCGTGKTCTCGGTGAAAGTRCCRGAT	660
gyrB-VC.con	601	.....G..W..G..W.....G..G.....	660
gyrB-VH.con	661	CCTAAATTTCTCRAGCCAAACAAAGATAAGCTRGTTTCTTCGGARGTGAATCCGCGGTT	720
gyrB-VC.con	661	.....G.....A..A.....R...	720
gyrB-VH.con	721	GAGTCAGCCATGAATGAGAAGCTGGCGGATTTCTGCGGAAAACCCAAGCGAAGCGAAA	780
gyrB-VC.con	721	..R....Y.....R.....A.....	780
gyrB-VH.con	781	AACGTTTGTTCGAAGATTATTGATGCRGCRGCGTCTCGTGAAGCVGCGGTAAAGCACGT	840
gyrB-VC.con	781	.....Y..K.....S.....C..K	840
gyrB-VH.con	841	GAAATGACYCGTCGTAAAGGCGCGCTAGAYTTMGCTGGTTTGCCW	885
gyrB-VC.con	841	.....T..Y.....Y.G..TC.T..W..C..A..C	885

図6. *V. mimicus*のgyrB遺伝子塩基配列特異性情報

【図7】

rpoD-VH.con	1	ACACGTGAAGCGAAATCGATATTGCCAAGCGCATTGAAGATGGTATTAAACCAAGTTCAA	60
rpoD-VC.con	1	.....T.....	60
rpoD-VH.con	61	AGTGCGATTGCTGAGTATCCTGGAACCATCCATACATTCTTGAACAGTTTGACAAAGTT	120
rpoD-VC.con	61	.....T..T.....G.....TCGT...	120
rpoD-VH.con	121	CAGGCAGAAGAACTACGTCTGACTGAYCTGATTTCTGGTTTCGTTGATCCTAACGACATG	180
rpoD-VC.con	121	.....C.....G.....C.....C.....A.....Y.....	180
rpoD-VH.con	181	GAAACCGAAGCGCCAACTGCTACTCAGATCGGTTCTGAGCTCTCTGAAGCCGATCTCGCT	240
rpoD-VC.con	181	.....C.....G.....T..G..T.....G.....G	240
rpoD-VH.con	241	GATGAAGATGACGAGGTCGCGGAGGATGAAGACGAGATGAAGATGAAGACGGCGACGGT	300
rpoD-VC.con	241	.....T..CT...TC..A.....A.....C.....T.....	300
rpoD-VH.con	301	GAAAGYAGCGACAGCGAAGAAGAGTGGGTATTGACCCTGAGCTCGCTCGTGAGAAATTC	360
rpoD-VC.con	301	.....C.....C.....C.....A..G.....	360
rpoD-VH.con	361	AATGAAGTGGCGCGCAAGTTCCAAAACCTGCAATTAGCGGTTAATGAATTGGTTCGTGAC	420
rpoD-VC.con	361	.....Y.....	420
rpoD-VH.con	421	AGTAACCAAGCATCTGAAGCTTCAAGCCTGGTACTGGATATYTTCCGCGAATTCGCGCTA	480
rpoD-VC.con	421	...C..T....T.....G...GA..T..A...GY.....C.....T.....Y...	480
rpoD-VH.con	481	ACACCAAAACAATTGACCATTTGGTTGAAACTCTGCGTACCTCGATGGATCGTGTTCTGT	540
rpoD-VC.con	481	.....G.....C.....C.....C..T..A.....C	540
rpoD-VH.con	541	ACCCAAGAGCGYTTGGTGATGAAAGCVGTGGTTGAAGTCGCGAAAATGCCAAAGAAATCA	600
rpoD-VC.con	541	.....A..T....R.....G..A.....G....G.....G	600
rpoD-VH.con	601	TTTATTGCYCTRTTTACAGGCAATGAATCGAATGARGAATGGCTYGATAAAGTCTCTCGCT	660
rpoD-VC.con	601	..C..C..C..A.....A..G.....G.....C..T...	660
rpoD-VH.con	661	TCTGATAARCCCTTATGTACAAAAGTACGTGAGCAAGAAGACGATATTCGCCGCTCAATC	720
rpoD-VC.con	661	.....C..G.....C.....GCG.....C.....A..G..C.....T....T	720
rpoD-VH.con	721	CAAAAACCTCAGATGATCGAACARGAGACTTCACTGTCTGTTGAGCGTATCAAAGACATC	780
rpoD-VC.con	721	..G.....A..A.....G..A.....A.....A..C.....	780
rpoD-VH.con	781	AGCCGTCGTATGTCTATCGGTGAAGCGAAAGCTCGCCGTGCG	822
rpoD-VC.con	781	.....A.....G..R.....	822

図7. *V. mimicus*のrpoD遺伝子塩基配列特異性情報

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 誤判定の可能性が低く、かつ実用上十分な増幅効率と増幅特異性を有する、高性能なビブリオコレラ及びビブリオミミカス検出・定量・同定用特異遺伝子増幅プライマーの作製すること。

【解決手段】 本発明者等は、ビブリオコレラ及びビブリオミミカスとその近縁種のrpoD遺伝子およびgyrB遺伝子の部分塩基配列を決め、その系統関係を明らかにし、ビブリオコレラ及びビブリオミミカスそれぞれに特徴的な塩基を同定し、これを含む高特異性を有するプローブ、及び高特異性を有しかつ増幅効率に優れた遺伝子増幅用プライマーを設計することを可能とした。

【選択図】 なし

特願 2002-362878

ページ: 1/E

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000134970]

1. 変更年月日 1991年 5月31日

[変更理由] 住所変更

住 所 東京都中央区築地6丁目19番20号  
氏 名 株式会社ニチレイ